

Germinação de sementes e desenvolvimento embrionário de *Corema album*

Efeito dos tratamentos físicos e químicos

Ana Carolina Oliveira Lisboa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica – Hortofruticultura e Viticultura

Orientadores: Professora Doutora Cristina Maria Moniz Simões de Oliveira

Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira

Júri:

Presidente: Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Teresa Moreira Valdivieso, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária;

Doutor Pedro Nogueira Brás de Oliveira, Investigador Auxiliar do(a) Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, orientador

2017

Agradecimentos

Ao Investigador Doutor Pedro Oliveira, orientador desta dissertação, pela oportunidade, pelo apoio, motivação, pela disponibilidade e incansável ajuda.

À Professora Doutora Cristina Oliveira, orientadora desta dissertação, pela dedicação, pelo rigor, pela compreensão e por toda a motivação transmitida ao longo da execução deste trabalho.

À Doutora Maria Teresa Moreira Valdiviesso, agradeço por ter estado sempre muito presente, pela disponibilidade e grande ajuda, pela partilha do conhecimento e a amizade ao longo da execução deste trabalho.

À Cândida Trindade, agradeço toda a ajuda incondicional no laboratório, pela simpatia e pelos conselhos.

À Investigadora Doutora Filomena Nóbrega, pela disponibilidade, pela simpatia, e ajuda ao longo deste trabalho.

Ao Francisco Barreto, à Francisca, à Xana, à Fernanda, e todos os funcionários do INIAV que de alguma forma me ajudaram.

À minha irmã Joana por todo o companheirismo, por todas as horas de espera, pela ajuda incansável no laboratório, por ser quem é e me apoiar em todos os momentos, por tudo.

Aos meus pais e família, que sempre me apoiaram em todo o meu percurso académico, pelo exemplo e toda a compreensão.

A todos os meus amigos, pelos momentos de partilha e pelas amizades.

Resumo

No ensaio 1, pretendeu-se avaliar o efeito de pré-tratamentos e estratificação na germinação de sementes de 4 genótipos de *Corema album* (L.) D. Don, em condições controladas de temperatura. Os pré-tratamentos baseiam-se na escarificação química com ácido sulfúrico ou embebidas em água destilada, sujeitas a diferentes condições de fotoperíodo e ciclos de temperatura (4°/5°C e 15°/25°C) e com ou sem aplicação de 1000 ppm de GA₃ (ensaio 1).

Fizeram-se cortes histológicos dos embriões de sementes do ensaio 1, para analisar o estado de desenvolvimento dos mesmos durante as diversas fases do ensaio, observando que os embriões já se apresentavam com os cotilédones formados, concluindo-se que os embriões não se encontravam sub-desenvolvidos isto é, não tem dormência morfológica.

Com a análise das sementes à lupa, observou-se uma estrutura no episperma da semente que permite que haja trocas gasosas e água entre a semente e o meio (cicatriz micropilar), concluindo-se, assim, que as sementes são permeáveis à água.

Verificou-se uma maior percentagem média de germinação (100% no genótipo AM8) em sementes sem escarificação química, mas com estratificação quente e fria e aplicação de GA₃ (ensaio 1).

Foi também realizado um segundo ensaio (ensaio 2), com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes ciclos de alta/baixa temperatura na dormência e, consequentemente, germinação das sementes. No ensaio 2.1, os ciclos foram realizados com temperaturas de 40°, 60°, 4° e 15°/25°C. No ensaio 2.2, realizaram-se ciclos com temperaturas de 40°, 4°, 15°/25°C. No ensaio 2.1 verificou-se que 60°C conduziram à morte do embrião das sementes, enquanto que no ensaio 2.2, três ciclos de alta/baixa temperatura (40°C durante 4 semanas, 4°C durante 4 semanas, 40°C durante 4 semanas e tratamentos de alta/baixa temperatura antes de iniciar o ensaio) permitiram obter as maiores taxas de germinação em todos os genótipos (49%). A taxa de germinação foi estatisticamente diferente entre os genótipos (AM8, AM11) versus (AM17, AM19) ($p < 0,05$).

Palavras-chave: *Corema album*, escarificação química, germinação das sementes, embrião

Abstract

In test 1, the effect of pre-treatments and stratification on the seed germination of 4 genotypes of *Corema album* (L.) D. Don, under controlled temperature conditions, was evaluated. Pre-treatments are based on chemical scarification with sulfuric acid or soaked in distilled water, subject to different photoperiod conditions and temperature cycles (4°/5°C and 15°/25°C) and with or without the application of 1000 ppm of GA₃ (test 1).

Histological sections of the seed embryos of test 1 were analysed to analyse their developmental state during the various phases of the test, noting that the embryos were already present with the cotyledons formed, concluding that the embryos were not sub-developed so, has no morphological dormancy.

With the analysis of the seeds under a microscope, a structure was observed in the seed episperm that allows gas and water exchanges between the seed and the medium (micropyle), thus concluding that the seeds are permeable to water.

There was a higher average germination percentage in seeds without chemical scarification, but with hot and cold stratification and application of GA₃ (test 1).

A second experiment (test 2) was also carried out to evaluate the effect of different high / low temperature cycles on dormancy and, consequently, seed germination. In test 2.1, the cycles were performed with temperatures of 60°, 4° and 15°/25°C. In test 2.2, cycles were performed with temperatures of 40°, 4°, 15°/25°C. In test 2.1, it was found that 60°C resulted in the death of the seed embryo, whereas in trial 2.2, two high / low temperature cycles (40°C for 4 weeks, 4°C for 4 weeks, 40°C for 4 weeks and high / low temperature treatments before starting the test) Germination rates in all genotypes (49%). The germination rate was statistically different between the genotypes (AM8, AM11) versus (AM17, AM119) ($p < 0.05$).

Keywords: *Corema album*, chemical scarification, seed germination, embryo

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract.....	iii
Índice	iv
Índice de figuras	vi
Índice de quadros	viii
Abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. A espécie <i>Corema album</i>	3
2.1.1. Condições climáticas	4
2.2. A semente	5
2.2.1. A formação da semente	5
2.2.2. Conceito funcional da semente	5
2.2.3. Composição química da semente	7
2.2.4. Desenvolvimento da semente	8
2.2.4.1. Fatores que afetam a germinação.....	9
2.2.5. Dormência da semente	11
2.2.5.1. Métodos para a quebra da dormência	13
2.2.6. Testes de viabilidade	14
2.3. A germinação de sementes de <i>Corema album</i>	16
3. Material e métodos	18
3.1. Material vegetal em estudo	18
3.1.1. Preparação das sementes.....	18
3.1.2. Dimensão das sementes	19
3.1.3. Tratamentos.....	20
3.1.3.1. Ensaio 1. Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação.....	20
3.1.3.2. Ensaio 2. Efeito de diferentes ciclos de alta/baixa temperatura	22

3.1.4. Monitorização	25
3.1.5. Contagens	25
3.2. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados	26
3.3. Observações histológicas	27
3.3.1. Colheita de material vegetal e fixação	27
3.3.2. Inclusão e Montagem em blocos de parafina.....	29
3.3.3. Cortes histológicos	29
3.3.4. Coloração	30
3.3.5. Observações Microscópicas.....	30
4. Resultados e Discussão	32
4.1. Características das sementes utilizadas no ensaio	32
4.2. Germinação das sementes	33
4.2.1. Ensaio 1. Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação.....	34
4.2.2. Ensaio 2. Efeito de diferentes ciclos de alta/baixa temperatura	44
4.3. Análise das observações microscópicas dos cortes histológicos.....	48
5. Conclusões e Perspetivas	51
6. Referências bibliográficas	53
Anexos.....	59
Anexo I -Protocolos de histologia	59
Anexo II – Análise estatística da percentagem de germinação nos ensaios 1 e 2	61

Índice de figuras

Figura 1 - Localização e diagramas ombrotérmicos de seis zonas onde se pode encontrar <i>Corema album</i> (Clavijo, A. et al, 2003)	4
Figura 2 - Sementes de <i>C. album</i> fotografadas à lupa, indicando o diâmetro maior (a) e diâmetro menor (b).	19
Figura 3 - Lupa (Leica DMA 1000). A aquisição da imagem foi realizada com o programa Leica Application Suite (LAS) version 4.4.0.	31
Figura 4 - Localização da cicatriz micropilar (seta) que permite a entrada de água e trocas gasosas no tegumento da semente de <i>Corema album</i>	34
Figura 5 - Fases de desenvolvimento da germinação da semente de <i>C. album</i> , sem episperma.	34
Figura 6 - Semente de <i>C. album</i> com episperma quebrado, obtido através da lupa (Leica DMA 1000).	35
Figura 7 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM8. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).	36
Figura 8 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM11. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).	36
Figura 9 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM17. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).	37
Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM19. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).	37
Figura 11 - Semente de <i>C. album</i> aberta (apenas com uma valva), com embrião+endosperma e perisperma, obtido em lupa (Leica DMA 1000). a) semente de <i>C. album</i> saudável; b) Semente de <i>C. album</i> com embrião decomposto; c) embrião necrosado de <i>C. album</i>	38
Figura 12 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de <i>C. album</i> do genótipo AM8;	44
Figura 13 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de <i>C. album</i> do genótipo AM11;	45
Figura 14 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de <i>C. album</i> do genótipo AM17	45
Figura 15 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de <i>C. album</i> do genótipo AM19	45
Figura 16 - Corte longitudinal de um embrião de <i>Corema album</i>	49

Figura 17 - Estádios de maturação do embrião a 3 de dezembro de 2016 (após embebição das sementes).....	49
Figura 18 - Estádios de maturação do embrião a 19 de maio de 2016 antes da aplicação GA ₃	50
Figura 19 - Estádio de desenvolvimento dos embriões de <i>C. album</i> , a 10 de outubro de 2016, data correspondente ao final do ensaio.	50

Índice de quadros

Quadro 1 - Características dos frutos dos genótipos em estudo e respectivas coordenadas GPS. (Oliveira, comunicação pessoal, 2016), colhidas na Aldeia do Meco.	18
Quadro 2 - Data de início dos tratamentos.....	19
Quadro 3 - Tratamentos do ensaio 1. Com respectivas datas até ao final do ensaio	21
Quadro 4 - Tratamentos efetuados no ensaio 2.1, com respectivas datas. Neste ensaio utilizaram-se 4 genótipos (AM8, AM11 e AM19) e as sementes não foram submetidas a tratamentos de escarificação química.	22
Quadro 5 - Tratamento de sementes no ensaio 2.2, com as respectivas datas. Neste ensaio utilizaram-se 4 genótipos (AM8, AM11, AM17 e AM19) e as sementes não foram submetidas a tratamentos de escarificação química.	24
Quadro 6 - Data de colheita de sementes de camarinha para análise	27
Quadro 7 - Níveis de desenvolvimento de embriões de <i>C. album</i> , visualizados através de cortes histológicos do embrião em lupa (Leica DMA 1000).....	31
Quadro 8 - Características (área, diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio) de sementes secas extraídas de bagas brancas, de quatro genótipos diferentes, todos provenientes da Aldeia do Meco	32
Quadro 9 - Percentagem de germinação dos quatro genótipos em cada tratamento do ensaio 1- Efeito dos pré-tratamentos e escarificação química na germinação.....	39
Quadro 10 - Percentagem de germinação dos quatro genótipos em cada tratamento do ensaio 1- Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação, com os embriões das sementes decompostos ou necrosados, retiradas.	43
Quadro 11 - Percentagem de germinação média em cada genótipo nos diferentes tratamentos de altas/baixas temperaturas (ensaio 2.2).	47

Abreviaturas, acrónimos, siglas e símbolos

Ø	Diâmetro
®	Marca Registrada
CF	Câmara frigorífica
CG	Câmara de germinação
ed.	Edição
I.P.	Instituto Público
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
p.	Página(s)
ppm	Partes por Milhão

1. Introdução

Corema album (L.) D. Don, vulgarmente designado por camarinha, é uma de duas espécies pertencente ao Género *Corema*, sendo *Corema conradii* (Torr.) Torr. ex Loudon, a outra espécie, endémica da costa Noroeste dos Estados Unidos da América. (Oliveira & Dale, 2012)).

As bagas de *Corema album* são uma importante fonte de água, fibras e açúcares totais, com baixa textura e elasticidade (Andrade *et al.*, 2015), havendo elevada potencialidade de ser integrada no mercado dos pequenos frutos, uma vez que se inclui sob o nome genérico de pequenos frutos, todos os frutos pequenos de tamanho ("small fruits") que possuem polpa branda ("soft fruits"), normalmente de forma redonda que são para ser consumidos em fresco, independentemente da estrutura do fruto (Oliveira & Dale, 2012).

Tem havido um crescente interesse de estabelecer esta espécie como cultura, mas a informação sobre o seu sistema de reprodução é escassa, o que é essencial para a sua gestão sustentável e conservação. (Oliveira *et al.*, 2016)

Estudos desenvolvidos anteriormente demonstraram que existe uma variação na percentagem de germinação de sementes provenientes de locais diferentes, mas do mesmo ano de colheita, bem como de sementes da mesma localização, mas anos diferentes de colheita (Santos, 2013). O presente ensaio foi realizado no Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV, I.P.) em Oeiras e teve como objetivo principal a otimização de estudos anteriores relativos à germinação de sementes de *Corema album* e respetivos estados de maturação do embrião com vista ao melhoramento num futuro próximo.

Associado ao ensaio surgem várias questões: a) As sementes são permeáveis à água? b) Qual o melhor tratamento para a quebra da dormência de *C. album* e consequentemente maior percentagem de germinação?; c) A semente de *C. album* apresenta dormência morfofisiológica?; d) Os embriões das sementes de *C. album* encontram-se sub-desenvolvidos?

A conjugação de escarificação química, seguida de estratificação quente e posterior estratificação fria está descrita como necessária a alguns géneros por forma a facilitar a quebra da dormência morfofisiológica de sementes com embriões pequenos e não desenvolvidos (Baskin *et al.* 2002).

Foram feitos dois ensaios, no primeiro as sementes foram submetidas a tratamentos de escarificação química e/ou estratificação, uma vez documentado (Santos, 2013), que os embriões de *C. album* apresentam dormência. Foi também estudado o efeito do ácido giberélico (GA₃) na germinação. Kermode (2011), sugere que as giberelinas (GA's) são geralmente muito eficazes na quebra da dormência. A aplicação de GA's, muitas vezes, contorna a necessidade de fatores de quebra de dormência "convencionais", tais como arrefecimento húmido, luz e nitrato de potássio, mas, deve-se notar que as sementes com dormência fisiológica profunda podem não responder aos GA's e exigir longos períodos de arrefecimento húmido.

No segundo ensaio foi analisado o efeito de altas/baixas temperaturas (60° ou 40°, 4° e 15°/25°C) na germinação de sementes de *C. album*.

Os embriões das sementes de *C. album* foram analisados ao nível histológico, observando assim o estado de desenvolvimento do embrião ao longo do ensaio.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A espécie *Corema album*

A costa atlântica da Península Ibérica, que se estende desde a Finisterra ao Estreito de Gibraltar, tem grandes formações de sistemas dunares. Uma das espécies características destes sistemas é a *Corema album*. Vulgarmente designada de camarinha ou camarinheira, é um pequeno arbusto dióico, perene, que pode atingir até um metro de altura. Esta espécie é classificada como uma angiospérmica dicotiledónea pertencente à família *Ericaceae* (anteriormente *Empetraceae*), inserida na subfamília *Ericoideae* e na ordem *Ericales* (Oliveira & Dale, 2012). É uma das espécies endémicas mais características dos sistemas dunares da costa Atlântica da Península Ibérica, sobre arribas rochosas e por vezes em subcoberto de pinhais (Fig. 1). Estes habitats têm sofrido um crescente impacto humano nos últimos tempos (Clavijo *et al.*, 2002). Esta degradação das zonas costeiras coloca-a como uma espécie em risco (Ortiz *et al.*, 1998) dado que as suas populações se encontram em regressão em número e tamanho como consequência do desenvolvimento urbano nas zonas costeiras, do impacto do turismo nas dunas de areia e do impacto de espécies invasoras, como por exemplo da *Acacia sp.* (Calviño-Cancela, 2005).

A *Corema album* é uma de duas espécies pertencente ao género *Corema* (L. 1758), sendo *Corema conradii* (Torr.) Torr. ex Loudon, a outra espécie, endémica da costa Noroeste dos Estados Unidos da América (Oliveira & Dale, 2012). A *Corema conradii* existe no Este da América do Norte, distinguindo-se bem da *C. album*, pois apresenta frutos bastante menores, desprovidos de parte carnuda, e cobertos com apêndices oleosos (Martin, 1946).

A *C. album* possui um caule prostrado com numerosas ramificações e comprimento que varia entre os 30 e os 75 cm, mantendo-se verde todo o ano (Franco, 1984; Tutin *et al.*, 1972). As folhas de 8 a 10 mm de comprimento e 1 mm de largura estão em verticilos de 3 ou 4, com pecíolos curtos (Oliveira e Dale, 2012).

O número de flores por inflorescência varia conforme os sexos, mas nunca excede as 20 flores (Álvarez – Cansino *et al.*, 2010; Guitián, *et al.*, 1997). As flores masculinas dispõem-se em inflorescências terminais, com 3 estames de tonalidade avermelhada, as flores femininas estão agrupadas no mesmo tipo de inflorescência, com pétalas de 1mm. A polinização é anemófila (Clavijo *et al.*, 2002). As bagas amadurecem durante o verão, havendo maior disponibilidade em agosto e início de setembro (Calviño-Cancela, 2000). Estes frutos, brancos ou brancos rosados, são drupas com 5 a 8 mm de diâmetro, normalmente com três pirénios (sementes) (Simmonds & Blackwell, 1999; Tutin *et al.*, 1972). O fruto é comestível, com um sabor agradável e bastante refrescante (Gonzalez, 2001). Consumidos em fresco desde há vários séculos são, ainda hoje, vendidos em alguns mercados públicos na Galiza e nas zonas costeiras de Portugal. Foi utilizado na medicina tradicional para baixar febres e matar lombrigas (Gonzalez, 2001). Relativamente a características organolépticas, as bagas apresentam um sabor moderadamente ácido e cítrico. Contêm muitos antioxidantes, baixas quantidades de antocianinas, elevadas quantidades de flavenol, e ácido fenólico (Santos *et al.*, 2009).

A espécie *C. album* pode ser propagada pela via seminal, como foi demonstrado por diferentes autores (Costa, 2011; Santos, 2013) ou por via vegetativa através de estacas (Magalhães, 2015).

Existe um grande investimento desta espécie na reprodução, quer pelo número de frutos produzidos, quer pelo tempo dedicado ao crescimento reprodutivo, facto que estará intimamente ligado às condições agrestes do seu habitat. São estas condições que promovem, inclusive um forte crescimento vegetativo em simultâneo com a floração, aumentando a sua duração e o número de flores, de modo a aumentar a probabilidade de reprodução. (Magalhães, 2015).

2.1.1. Condições climáticas

As condições meteorológicas em Portugal Continental são condicionadas essencialmente por fatores permanentes, designadamente a latitude (região de transição entre a zona dos anticlones subtropicais e a zona das depressões subpolares do hemisfério Norte), a orografia, a influência do oceano Atlântico e a continentalidade. Junto à costa, a estes fatores, acresce a influência das orientações dominantes da linha de costa (Marques, 2007).

Nas regiões costeiras, a precipitação que ocorre sobre a forma de chuva, de chuveiro, de aguaceiros, de granizo e muito raramente de neve, decresce de norte para sul. Na Fig.1 encontram-se representados 6 locais onde se pode encontrar facilmente exemplares de *Corema album* e respetivos diagramas ombrotérmicos dessas regiões.

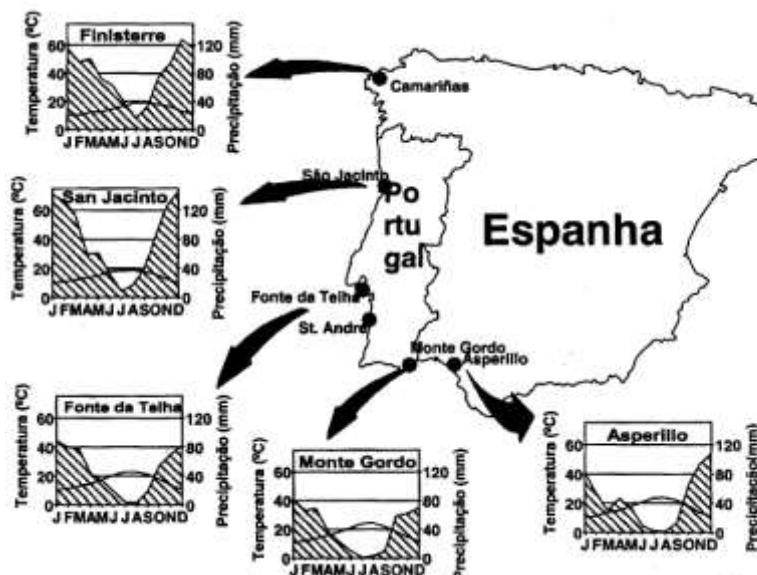


Figura 1 - Localização e diagramas ombrotérmicos de seis zonas onde se pode encontrar *Corema album* (Clavijo, A. et al, 2003)

2.2. A semente

2.2.1. A formação da semente

A formação da semente representa o início de uma nova geração, que só ocorre após a maturação sexual da planta. A abertura do botão floral é o primeiro passo para a sua formação (Propinigis, 1985). A fecundação (fusão de núcleos de pólen e óvulos), produz um zigoto diploide, que se diferencia no embrião, a próxima geração da planta (Bewley, *et al.*, 2013). A semente é o produto do óvulo fertilizado, e no momento em que se separa da planta-mãe, pode germinar para dar origem a um novo indivíduo (Bradbeer, 1988). Na produção de sementes, as plantas podem ter até quatro objetivos principais, a re-classificação do material genético, a dispersão, a multiplicação e a sobrevivência. A semente é a estrutura na qual o embrião normalmente desenvolvido é disperso e que lhe permite sobreviver no período entre a maturação e o estabelecimento das plântulas, garantindo assim o início da próxima geração (Koornneef *et al.*, 2002). Relativamente às sementes de *C. album*, estas estão dependentes de vetores animais para a sua dispersão. Na arribafóssil da Costa da Caparica o principal dispersor de *C. album* é o coelho-bravo *Oryctolagus cuniculus* (L.) (Clavijo *et al.*, 2003; Costa, 2011), no entanto este está cada vez mais ausente deste local devido à pressão antropogénica e epizootias, originando uma probabilidade cada vez menor de dispersão e regeneração das populações de *C. album*. (Lopes, 2015). Neste contexto, a endozocoria assume importância vital, não só pelo seu papel na dispersão, mas também como potenciador quer da germinação das sementes através da remoção da polpa e de compostos químicos que poderão ser inibidores de germinação (D'Antonio *et al.*, 1993).

No desenvolvimento do embrião das angiospérmicas, as divisões nucleares são na maioria dos casos seguidas imediatamente por formação de parede celular, sendo o resultado destas divisões o mais comum, uma fila de células ligadas a um embrião globular. O desenvolvimento posterior do embrião resulta na diferenciação da radícula, do ápice da planta e dos cotilédones (Bradbeer, 1988). O embrião das dicotiledóneas desenvolve dois cotilédones localizados lateralmente que encerram entre as bases o ápice relativamente pequeno da secção terminal, enquanto os embriões das monocotiledóneas mostram uma série de padrões de desenvolvimento cotiledonar de uma origem aparentemente lateral do cotilédone único a uma origem aparentemente terminal, a origem do ápice variando inversamente do terminal ao lateral (Bradbeer, 1988).

2.2.2. Conceito funcional da semente

A semente, do ponto de vista funcional é constituída pelas seguintes estruturas:

Episperma:

O episperma, comumente designado de tegumento ou casca da semente, é composto por uma ou duas camadas, dependendo do primórdio seminal possuir um ou dois tegumentos (Aguilar, 2013a). Trata-se do revestimento que envolve a semente, de origem maternal, que pode

consistir apenas por tegumento ou, por vezes, também por pericarpo. O tegumento é constituído por camadas celulares originárias dos tegumentos ovulares (Propinigis,1985). O episperma é geralmente seco, caso seja seco e muito rígido denomina-se esclerotesta, se pelo contrário é carnudo e mole titula-se sarcotesta (Aguiar, 2013a).

Eixo embrionário:

O embrião tem origem no zigoto, constituído pelo eixo embrionário e cotilédones (com ou sem função de reserva) onde, por sua vez, o eixo é composto pela radícula ou raiz embrionária, dois entrenós caulinares, o hipocótilo (localiza-se entre a radícula e os cotilédones), o epicótilo (localiza-se entre os cotilédones e a plúmula) e a plúmula (inclui um meristema apical caulinar envolvido por esboços foliares). Na semente a radícula está situada na proximidade do micrópilo e a plúmula na zona da calaza. O eixo embrionário tem função reprodutiva, tendo a capacidade de iniciar divisões celulares (Propinigis,1985). Estas estruturas são fáceis de identificar no embrião das dicotiledóneas (Bewley *et al*, 2013).

Tecidos de reserva:

O eixo embrionário depende de uma fonte de energia e de substâncias orgânicas para a elaboração de novas paredes celulares, citoplasma e núcleos, desde o início da germinação até que a plântula se torne autotrófica, isto é, é capaz de sintetizar matérias orgânicas através da fotossíntese (Propinigis,1985). A esta fonte dá-se o nome de tecidos de reserva, que se destinam a alimentar o embrião em crescimento, durante a germinação da semente. Segundo Propinigis, (1985), a análise microscópica de uma semente madura mostra que todas as células do perisperma, do endosperma e do embrião têm o aspeto de estar cheias de reservas, nas quais a germinação da plântula é dependente até o ponto de se tornar auto-suficiente fotossinteticamente ou ter acesso a alguma outra fonte de nutrientes.

As principais reservas são representadas por lipídios, hidratos de carbono e proteínas que fornecem carbono e energia para o crescimento do embrião e todos os processos envolvidos. O principal hidrato de carbono de reserva das sementes é o amido e as principais proteínas de reserva são o glúten e grãos de aleurona. Podem ainda ser encontrados, em pequenas quantidades, minerais, vitaminas e outras substâncias. (Propinigis,1985).

Nas sementes, as reservas armazenadas podem encontrar-se dentro de tecidos embrionários e extra-embrionários (endosperma e perisperma), mas em proporções diferentes, por exemplo, em cereais o maior conteúdo de amido e proteína está no endosperma, mas o óleo está presente no embrião (Bewley *et al*, 2013).

Cotilédones:

São órgãos de reserva das sementes cotiledonares. Os cotilédones fazem parte do embrião. Em muitas espécies, o embrião desenvolve-se bastante, absorvendo todo o endosperma e acumulando as substâncias de reserva nos cotilédones (Propinigis,1985). Os cotilédones absorvem nutrientes armazenados no endosperma e têm um papel de proteção para o epicótilo

durante a germinação em espécies nas quais os cotilédones emergem da semente (Kozlowski, 1971).

Endosperma:

É o tecido de reserva das sementes albuminosas (sementes com endosperma) (Aguilar, 2013a). Segundo Propinigis, (1985) o núcleo do endosperma primário é formado pela fusão de um núcleo reprodutivo (do grão de pólen) com dois núcleos polares ou com o núcleo secundário, inicia um processo contínuo de divisões, que culmina com a formação do endosperma. O endosperma nutre o embrião durante o seu desenvolvimento, e pode ser ou não completamente absorvido (Propinigis,1985).

Perisperma:

Desenvolve-se através de partes do nucelo ou dos tegumentos, quando não completamente absorvidos durante a formação do embrião (Propinigis,1985). Este tecido é característico de sementes perispérmicas.

2.2.3. Composição química da semente

Segundo Toledo & Marcos (1977), a composição química das sementes apresenta as mesmas substâncias e elementos químicos encontrados nos restantes órgãos da planta. Esta composição tem grande importância porque as sementes armazenam reservas que proporcionam nutrientes e energia para satisfazer as necessidades vitais para a plântula na fase de germinação.

De acordo com Nakagawa (1980), as sementes apresentam uma composição química bastante variável. Caracterizam-se por apresentarem, os principais constituintes:

Hidratos de carbono: são encontrados em maior quantidade na maioria das sementes, são eles, o amido, os açúcares e hemiceluloses (Brasil, 2008).

Lipídios: constituem uma importante reserva alimentar, sendo uma das grandes fontes de energia usadas pela semente na germinação. Geralmente são mais abundantes no embrião do que no endosperma (Brasil, 2008).

Proteínas: são polímeros de aminoácidos sintetizados biologicamente em todas as células vivas, funcionam como enzimas, e são encontradas em todos os tecidos das sementes, apresentando-se em maiores concentrações no embrião (Brasil, 2008).

Outros componentes: podem-se ainda encontrar minerais, alguns aminoácidos e alcaloides como constituintes azotados das sementes que nem sempre se apresentam na mesma proporção que nas outras partes da planta. Um exemplo clássico é a cafeína no café. Outros constituintes são as fitohormonas, tanto os promotores, como os inibidores de crescimento, que estão relacionados com dormência e de germinação (ex: ácido abísico) (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1978).

2.2.4. Desenvolvimento da semente

Segundo Propinigis (1985) a maturação da semente compreende transformações morfológicas, fisiológicas e funcionais que se sucedem no óvulo fertilizado, e que culminam com o atingir do ponto máximo do peso de matéria seca. Para além disso, neste ponto, a semente atinge também o máximo poder germinativo e máximo vigor, sendo por isso denominado “ponto de maturidade fisiológica”.

O desenvolvimento da semente compreende três etapas: (i) embriogénese; (ii) diferenciação e acumulação de reservas; (iii) maturação da semente (Aguilar, 2013b).

(i) embriogénese: o desenvolvimento embrionário (embriogénese) é acompanhado pelos tecidos de armazenamento, como o endosperma, e o tegumento, que na semente madura pode denominar-se “casca” da semente. O desenvolvimento de sementes requer interações próximas entre as três estruturas básicas das sementes em termos de regulação da expressão genética e suprimento de nutrientes, o que também determina o tamanho e a qualidade das sementes (Bewley, *et al.*, 2013)

(ii) acumulação de reservas: as reservas estão localizadas dentro do próprio embrião ou num tecido de armazenamento alternativo, por exemplo, o endosperma de grãos de cereais e os cotilédones das culturas de dicotiledóneas. A sacarose é a principal fonte de carbono para a síntese de reservas, e aminoácidos a fonte de azoto (Bewley & Black, 1982). A qualidade e o rendimento das reservas de armazenagem são consideravelmente influenciados pelas condições ambientais prevalecentes antes e durante a sua síntese. A mobilização das maiores reservas dentro dos tecidos de armazenamento de sementes ocorre após a conclusão da germinação para fornecer nutrientes para a plântula em crescimento até que se torne autotrófica. O amido, as hemiceluloses, os triacilgliceróis (óleos) e proteínas são mobilizados por enzimas, muitas das quais são transcritas e sintetizadas de novo (Bewley, *et al.*, 2013).

(iii) maturação da semente: inclui a etapa em que a semente atinge a maturidade fisiológica, isto é, o momento em que a semente não se encontra ligada pelo funículo à planta mãe (Hartmann *et al.*, 1996). O desenvolvimento das células embrionárias e dos tecidos dependem da distribuição das auxinas durante sua embriogénese precoce; A deposição de reservas armazenadas e a prevenção da germinação precoce é controlada pelo ácido abscísico durante as fases finais do desenvolvimento das sementes. A acumulação de proteínas específicas e oligossacarídeos durante a maturação está associada à aquisição de tolerância à dessecação que permite que as sementes sobrevivam sem água durante a maturação (Bewley, *et al.*, 2013).

2.2.4.1. Fatores que afetam a germinação

A germinação de sementes é uma das fases críticas para o estabelecimento das plantas em condições naturais. Fisiologicamente, a germinação inicia-se com a embebição de água pela semente, seguida da retoma do crescimento do embrião quiescente e terminando com a protrusão de alguma parte deste por meio do tegumento. O processo de germinação inicia-se com o ressurgimento das atividades metabólicas que foram quase que paralisadas após a maturação da semente (Bewley & Black, 1982).

O tipo de condições ambientais necessárias para a germinação é controlada pelo genótipo. Os processos fisiológicos do crescimento exigem atividades metabólicas aceleradas e a fase inicial da germinação exige primeiramente uma ativação desses processos. Existem diversos fatores que podem afetar a germinação, os quais podem estar relacionados com a viabilidade e longevidade da semente, mas também por fatores externos, tais como:

Água:

A primeira condição para a germinação de uma semente viável e não dormente é a disponibilidade de água para a sua reidratação (Propinigis, 1985). As sementes viáveis necessitam de um nível adequado de hidratação que permita que se dê a ativação do processo metabólico, emergência da radícula e estabelecimento da plântula, isto é, a absorção de água é fundamental para que ocorra o processo de germinação. Contudo, a germinação pode ser afetada tanto pela carência como pelo excesso de água (Baskin & Baskin, 2001). Baskin & Baskin (2001) afirmam que as sementes devem ser pesadas e posteriormente submersas em água, durante um determinado período de tempo, e caso as sementes não aumentem de peso significa que as sementes são impermeáveis. Uma vez impermeáveis, torna-se necessário submeter as sementes a tratamentos que facilitem a absorção de água (Santos, 2013). A impermeabilidade à água de sementes duras é considerada uma dormência física (Nikolaeva, 1969). O funículo, todo ou em parte, sofre abscisão, deixando no local onde se separa da semente, uma cicatriz denominada hilo, que é, geralmente a região de maior permeabilidade da semente em função da menor espessura dos tegumentos, permitindo a entrada de água durante a embebição e as trocas gasosas efetuadas durante o processo de germinação.

Temperatura:

Os efeitos da temperatura na germinação de sementes podem ser avaliados pelas mudanças ocasionadas na percentagem, velocidade e frequência relativa de germinação durante o período de incubação (Labouriau & Osborn, 1984). A temperatura pode atuar tanto como fator de quebra de dormência, como no controle da germinação de sementes. Pode-se dizer que a germinação ocorre dentro de certo limite cuja amplitude e valores absolutos dependem de cada espécie. Dentro da faixa de temperatura em que as sementes de uma espécie germinam, há geralmente uma temperatura ótima, acima e abaixo da qual a germinação é diminuída, mas não completamente interrompida. A temperatura ótima pode ser aquela em que a maior germinação

é alcançada no menor tempo (Mayer & Poljakoff-Mayber, 1979). Segundo Propinigis (1985) as temperaturas de germinação não apresentam um valor específico, mas podem ser identificadas três temperaturas críticas: temperatura mínima (abaixo da qual não há germinação), temperatura máxima (acima da qual não há germinação) e temperatura ótima (temperatura à qual germina um número máximo de sementes), ou seja, a temperatura ótima é a que permite obter uma percentagem de germinação mais elevada, num menor período de tempo (Edwards, 1932; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975).

Gases:

O oxigénio, dióxido de carbono e etileno têm um papel importante na dormência, germinação e estabelecimento da plântula (Baskin, & Baskin, 2001). Abordando primeiramente o oxigénio, segundo Propinigis (1985), o processo germinativo requer energia, fornecida pelas reações oxidativas. A maioria das espécies necessita de oxigénio para poder germinar, porém, a sua ausência, durante um determinado período de tempo, promove a germinação de sementes de determinadas espécies (Baskin & Baskin, 2001). Relativamente à presença de dióxido de carbono, valores entre 2-5% estimulam a germinação, e superior a 5% inibe-a, para a maioria das espécies (Baskin & Baskin, 2001; Mayer & Poljakoff-Mayber, 1975). O efeito do dióxido de carbono na germinação é influenciado por diversos fatores tais como temperatura, porosidade e pela presença de dormência nas sementes (Baskin & Baskin, 2001). O etileno está presente no solo, o que, em pequenas quantidades, estimula a germinação de algumas sementes e a sua produção pelas sementes surge logo após a embebição (Baskin & Baskin, 2001) esta presença é favorecida pela baixa concentração de oxigénio, elevada temperatura, presença de matéria orgânica e baixo pH.

Luz:

As sementes da maioria das espécies germinam tanto com ausência ou presença de luz. A exigência em luz de determinadas espécies está relacionada com a sua dormência (Propinigis, 1985). Flint e McAlister, citado por Toole, (1973) determinaram pela primeira vez os efeitos do comprimento de ondas de luz na germinação de sementes de alface. Verificaram que o efeito mais relevante na germinação foi com o espectro 600-700nm. Acima do comprimento de onda de 760 nm ocorre a inibição da germinação. Para que o efeito da radiação se verifique, a semente precisa de ser previamente embebida. Durante os testes de germinação, Baskin & Baskin, (2001) sugerem que as sementes devem ser submetidas à presença de luz por um período de 12 a 14 horas (dia), sendo este período coincidente com a temperatura mais alta a que as sementes estarão sujeitas.

Substrato:

Uma variedade de substratos, incluindo solo, areia branca, turfa, papel de filtro e papel absorvente, podem ser usados para testes de germinação. Existem, assim, fatores químicos, físicos e biológicos a considerar na escolha do substrato que influenciam a germinação de sementes, bem como o estabelecimento das plântulas (Hartmann, *et al.*, 1996). Para a

germinação é necessário que exista um bom contacto entre a semente e o substrato, sendo importante utilizar materiais com uma textura uniforme (Hartmann, *et al.*, 1996). O substrato não deve formar crosta na sua superfície, uma vez que irá dificultar a emergência de folhas acima desta. Segundo Baskin & Baskin (2001) o melhor substrato para germinar sementes é aquele que é colhido do local em que se encontra a espécie, em condições naturais (areia, no caso de *C. album*). Nalgumas espécies, o problema de percentagens de baixa germinação pode ser resolvido mudando o substrato utilizado para incubação de sementes.

2.2.5. Dormência da semente

Considera-se que uma semente está em condições de germinar quando o embrião se encontra completamente desenvolvido e diferenciado, não sendo necessário tratamentos para a quebra de dormência (Baskin & Baskin, 2004). Existem, no entanto, várias causas pelas quais uma semente não germina; (i) a semente pode ser inviável, ou quando viáveis, (ii) as condições ambientais são desfavoráveis à germinação, ou (iii) a dormência impede a germinação de uma semente viável sob condições favoráveis à germinação (Kermode, 2011).

Classifica-se a dormência das sementes de acordo com classes, níveis e tipos. Reconhecem-se seis classes de dormência de sementes. Duas das classes, dormência fisiológica e dormência morfofisiológica, são subdivididas em três e oito níveis, respetivamente, e o nível não profundo de dormência fisiológica é subdividido em cinco tipos (McDonald & Kwong, 2005).

Dormência morfológica:

A germinação não ocorre imediatamente (isto é, dentro de uma semana ou menos) após a sementeira porque o embrião se encontra subdesenvolvido (McDonald & Kwong, 2005).

Dormência fisiológica:

A germinação não ocorre porque existe um "problema fisiológico" no embrião que o impede de crescer e superar a restrição mecânica do revestimento da semente e outros tecidos de cobertura (se presentes). Quando o embrião se torna não-dormente, tem o potencial de crescimento para "empurrar" através da casca da semente e quaisquer outros tecidos que o rodeiam (Baskin & Baskin, 1998). A dormência fisiológica apresenta três níveis, profundos, intermédios e não profundos, que se baseiam na capacidade dos embriões de crescer, nos requisitos de temperatura para quebra de dormência e resposta aos reguladores de crescimento de plantas conhecidos, tais como as giberelinas (GA) (McDonald & Kwong, 2005).

A dormência não profunda é quebrada por períodos relativamente curtos (1 a 8 semanas) de estratificação quente e/ou fria, dependendo da espécie, e o ácido giberélico (GA₃) é eficaz na promoção da germinação (Baskin & Baskin, 1998); De acordo com Crocker & Barton, (1931), citado por Baskin, *et al.*, (2002), a dormência fisiológica intermedia é interrompida por períodos longos (8-14 semanas) de estratificação a frio, no entanto, o armazenamento a seco (após a maturação à temperatura ambiente) ou estratificação quente pode reduzir o comprimento do

período de estratificação a frio necessário para quebrar a dormência. Além disso, o GA₃ pode promover a germinação (Baskin, *et al.*, 2002); A dormência fisiológica profunda é interrompida por longos períodos de estratificação a frio, e o armazenamento a seco não diminui o comprimento do período de estratificação a frio necessário para quebrar a dormência; GA₃ não é eficaz na promoção da germinação (Baskin e Baskin, 1998; Baskin, *et al.*, 2002).

Dormência morfofisiológica:

Uma semente para além do embrião poder estar subdesenvolvido pode associar também dormência fisiológica. Assim, antes da emergência da radícula, a componente fisiológica da dormência tem de ser quebrada, e o embrião deve crescer até ao comprimento crítico específico da espécie (componente morfológica da dormência) (McDonald & Kwong, 2005). Dependendo da espécie, a dormência fisiológica é quebrada antes que o crescimento do embrião comece (Baskin & Baskin, 1990), ou enquanto o embrião está em fase de crescimento. Para que a dormência fisiológica seja quebrada pode-se recorrer a diversos tratamentos térmicos, tais como estratificação quente (ambiente húmido e temperatura $\geq 15^{\circ}\text{C}$), estratificação fria (ambiente húmido e temperatura entre $0-10^{\circ}\text{C}$) e estratificação quente seguida de estratificação fria (quente + fria) e fria + quente + fria (Baskin & Baskin, 2001; Santos, 2013). Segundo Finch-Savage & Leubner-Metzger (2006), a aplicação de ácido giberélico pode substituir os tratamentos térmicos (estratificação quente e/ou fria).

Dormência Física:

As espécies com dormência física têm um revestimento na semente que lhe impossibilita a embebição de água, mesmo em condições ambientais favoráveis. A impermeabilidade é devida à presença de uma ou mais camadas de parênquima paliçada, de células lignificadas, ou macro escleritos (McDonald & Kwong, 2005). Em diversas famílias de plantas em que as sementes são permeáveis, foi identificada uma estrutura especializada para a entrada de água na semente. Existem vários tipos de estruturas que diferem na origem do desenvolvimento e anatomia e têm como função a deteção de "sinais ambientais", isto é, quando há uma mudança ambiental, especialmente na temperatura, a estrutura abre, criando assim uma entrada de água (Baskin *et al.*, 2000).

Dormência combinada:

A germinação é impedida tanto pelo revestimento impermeável das sementes (ou fruto) como pelo embrião que se encontra dormente, ou seja, uma combinação de dormência física com dormência fisiológica. A dormência combinada ocorre em espécies herbáceas, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Geraniaceae* e *Malvaceae* (Baskin & Baskin, 1998). Sementes com dormência combinada germinam apenas quando ambas as dormências são quebradas.

Dormência Química:

De acordo com Nikolaeva (1969), sementes quimicamente latentes não germinam devido à presença de inibidores no pericarpo. A dormência apenas é quebrada pela remoção do pericarpo ou lixiviação dos frutos. Os inibidores de germinação foram encontrados também nos embriões,

endospermas e nas estruturas que às vezes são dispersas juntamente com as sementes de algumas espécies. Diversos estudos foram feitos e conclui-se que na maioria das sementes com inibidores de germinação também exibem dormência fisiológica.

2.2.5.1. Métodos para a quebra da dormência

Existem diferentes métodos para quebrar a dormência. Nas condições naturais, a dormência física pode ser quebrada por fatores como fogo, alternando altas e baixas temperaturas e humidade, ou passagem através do sistema digestivo de um animal. No laboratório, a quebra da dormência física requer habitualmente uma escarificação bastante severa, por exemplo, por meios mecânicos, tais como abrasão ou corte, ou pela aplicação controlada de ácido ou água quente. A dormência fisiológica pode ser interrompida por secagem após a maturação por períodos de tempo frequentemente prolongados. Após a quebra da dormência, a maturação pode ser acelerada através do aumento da temperatura de armazenamento, no entanto este processo também acelera o envelhecimento da semente (Kermode, 2011).

Um método muito comum para quebrar a dormência é a exposição de sementes embebidas a baixas temperaturas, normalmente entre 2 e 10 ° C (estratificação a frio). No entanto, as sementes de espécies com uma dormência muito mais profunda (fisiológica) podem requerer vários meses de estratificação a frio para quebrar a dormência. As sementes com dormência morfofisiológica podem necessitar de uma combinação de estratificação húmida e quente (> 15°C) para quebrar a dormência fisiológica e promover a maturação tardia ou o crescimento pré-germinativo do embrião (isto é, antes da emissão da radícula). As Giberelinas (GA's) são geralmente muito eficazes na quebra da dormência. A sua aplicação pode muitas vezes contornar a necessidade de fatores de quebra de dormência, tais como estratificação fria, luz e nitrato de potássio. Deve-se salientar que as sementes com dormência fisiológica profunda podem não responder a GA's e necessitar de longos períodos a baixas temperaturas e humidade (Kermode, 2011).

Simplificando, podem-se resumir a oito os métodos para quebra da dormência:

Estratificação fria:

As sementes são expostas a baixas temperaturas, normalmente entre 1°C e 0°C, em condições de elevada humidade, durante um período de tempo (Bradbeer, 1988). Este tratamento é utilizado em sementes de espécies arbustivas, para que ocorram modificações fisiológicas no embrião, necessárias para que haja a quebra da dormência (Propinigis, 1985).

Estratificação quente:

Muitas sementes, principalmente de gramíneas forrageiras e de hortaliças, perdem a dormência quando armazenadas num ambiente a 40°C (Propinigis, 1985). Baskin *et al.*, (2002), sugerem que a estratificação quente pode estar envolvida na quebra da dormência fisiológica nas sementes de muitas espécies.

Exposição à luz:

As sementes embebidas em água demonstram maior sensibilidade à luz, mas mesmo sementes secas ao ar podem responder favoravelmente (Bradbeer,1988). Segundo Propinigis (1985) as sementes devem ser iluminadas 8h/dia.

Lixiviação:

Com elevada precipitação, os inibidores das sementes tendem a lixiviar-se, o que faz com que haja quebra da dormência (Bradbeer,1988).

Escarificação:

A escarificação pode ser química ou mecânica. No método químico as sementes são submersas em ácido sulfúrico durante determinado tempo e posteriormente lavadas em água corrente. O método mecânico consiste na escarificação do tegumento, pericarpo, endosperma ou glumelas, que pode ser artificialmente realizada com um abrasivo (e.g. areia ou lixa). Em condições naturais a escarificação pode resultar na passagem pelo sistema digestivo de animais ou do efeito do fogo (o tegumento fendilha pela ação do mesmo) (Propinigis,1985). A embebição das sementes numa solução de nitrato potássio a 0,2%, em algumas espécies é eficaz para quebrar a dormência (Propinigis,1985).

Exposição a concentração elevadas de CO₂:

As plantas enterradas no solo têm maior probabilidade de serem sujeitas a teores mais elevados de CO₂ comparando com as sementes que se encontram à superfície (Aguiar, 2013b), pelo que o aumento da sua concentração pode promover a germinação.

Flutuações de temperaturas:

A flutuação diária de temperaturas pode aumentar a velocidade de germinação em algumas espécies (Aguiar, 2013b).

2.2.6. Testes de viabilidade

Uma semente viável tem a capacidade de germinar em condições adequadas. A definição inclui sementes dormentes, mas viáveis, caso em que a dormência deve ser quebrada antes que a viabilidade possa ser medida pela germinação. Uma semente não viável, é aquela que não consegue germinar mesmo sob condições ótimas, incluindo tratamentos para a remoção da dormência. De acordo com as Regras Internacionais para Testes de Sementes (International Seed Testing Association, 1985), são definidos critérios precisos para testar a viabilidade de todas as principais espécies de plantas cultivadas (Bradbeer,1988).

Os testes de viabilidade visam determinar se uma semente é ou não capaz de germinar.

Os testes de viabilidade podem ser diretos ou indiretos. Enquanto os diretos avaliam diretamente a germinação, promovendo a emergência das sementes, os indiretos avaliam a capacidade germinativa da semente, medindo também outros parâmetros como as atividades metabólicas e enzimáticas (Propinigis, 1985).

Teste de germinação:

Determina numa amostra a proporção de sementes vivas e capazes de produzir plantas normais e saudáveis. O princípio do teste consiste em submeter as sementes a todas as condições favoráveis possíveis relativamente à humidade, temperatura, oxigénio e substrato (Propinigis, 1985), durante determinado período de tempo (Baskin & Baskin, 2004; Hartmann *et al.*, 1996).

Teste de tetrazólio:

O teste baseia-se na atividade das enzimas desidrogenases nos tecidos vivos (Hartmann *et al.*, 1996). Quando a semente é imersa na solução incolor de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio esta é difundida nos tecidos, sendo que nas células vivas ocorre a redução do sal de tetrazólio (Gosling, 2003). Surge uma coloração de vermelho claro que significa que a semente é viável. A coloração de vermelho escuro poderá significar a presença de tecidos em deterioração, uma vez que estes permitem maior difusão da solução. A não coloração indica que as células não estão vivas, que não existe atividade enzimática, ou seja, a semente não está viável. (Santos, 2013).

Teste com raios-X:

Trata-se de um teste rápido e não destrutivo da semente, que permite determinar a percentagem de sementes vazias, isto é, sementes não viáveis, numa determinada amostra (Hartmann *et al.*, 1996). Permite, de igual modo, identificar sementes danificadas.

Teste de corte:

Este teste destrutivo tem como objetivo determinar a percentagem de sementes viáveis numa amostra. O teste consiste em cortar as sementes e através da observação do interior das mesmas avaliar o grau de desenvolvimento do embrião e o seu aspeto. O aspeto dos tecidos permite também identificar a presença de sementes vazias (Gosling, 2003).

2.3. A germinação de sementes de *Corema album*

A reprodução de *Corema album* pode estar associada a vetores animais. As bagas desta espécie são consumidas por diferentes vertebrados, coelhos, raposas, gaivotas e melros, (Calviño-Cancela, 2000), sendo a germinação das sementes facilitada pela passagem pelo aparelho digestivo destes animais. Nos sítios mais perturbados, a ausência de animais torna quase impossível a regeneração natural. Segundo Traveset, *et al.* (2008) e uma vez que as sementes desta espécie apresentam um endocarpo lenhoso, a passagem das sementes pelo tubo digestivo assegura o processo de quebra de dormência, uma vez que os seus invólucros ficam sujeitos à escarificação mecânica e/ou química, tornando as sementes mais permeáveis à passagem de água e gases. Posteriormente, as sementes são dispersas via defecação ou regurgitação no verão e a germinação e estabelecimento de plântulas ocorre no Inverno, após um período de dormência de, pelo menos, um a quatro anos (Calviño-Cancela, 2002, 2004, 2007). Segundo Calviño-Cancela (2004), o local de defecação ou regurgitação irá determinar as condições a que as sementes estarão sujeitas durante o processo de germinação.

Relativamente à germinação artificial, estudos anteriores demonstram uma taxa diminuta da germinação. Costa (2011), no seu ensaio obteve uma taxa de germinação em sementes de bagas brancas sujeitas a escarificação química e semeadas em substrato esterilizado de 23%. Concluiu que, *C. album* dificilmente germina em condições experimentais, pois, na natureza este processo está associado a vetores animais, visto a germinação de sementes que não passaram pelo trato digestivo de dispersores ser nula ou muito reduzida. Para avaliar esse efeito, Lopes (2015) no seu estudo pretendeu usar sementes de camarinha provenientes de dejetos de coelho, não tendo encontrado sementes desta espécie em quantidade suficiente para a realização de experiências de germinação. Lopes (2015) no ensaio concluiu que há uma limitação na dispersão de sementes de *C. album*, uma vez que os animais frugívoros, no caso concreto o coelho, parecem estar a alterar a sua dieta consumindo espécies invasoras com frutos suculentos como os de *C. edulis* (Chorão), não só reduzindo o consumo de frutos de *C. album* e as sementes dispersadas, como também originando posteriormente uma maior competição por espaço e recursos entre estas espécies após a sua dispersão e germinação.

Lopes (2015) no ensaio de germinação de sementes *C. album* retiradas do solo, atingiu uma taxa de germinação de 2,4%, com o tratamento de escarificação química.

Santos (2013), no ensaio de germinação de sementes de *C. album* apresentou a maior percentagem média de sementes germinadas (26%) com o tratamento de 30 minutos de escarificação, com ácido sulfúrico (98%). Concluiu que as sementes não apresentaram dormência física nem dormência combinada, isto é, as sementes foram capazes de embeber água, sendo o tegumento permeável, no entanto apresentaram dormência morfofisiológica. As sementes de *Corema album* de diferentes populações localizadas ao longo da sua área de

distribuição, apresentaram diferenças significativas em todas as diferentes características, em relação às diferentes origens (Santos, 2013).

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal em estudo

Os frutos de camarinha do presente estudo, provenientes de arbustos de *C. album*, foram colhidas na zona dunar da Aldeia do Meco. Foram selecionados 4 genótipos (AM8, AM11, AM17, AM19), de acordo com as características mencionadas no Quadro 1. Os frutos foram colhidos no estado de bagas brancas, a 14 de agosto de 2015.

Quadro 1 - Características dos frutos dos genótipos em estudo e respetivas coordenadas GPS. (Oliveira, comunicação pessoal, 2016), colhidas na Aldeia do Meco.

Genótipos	Coordenadas GPS	Características
AM8	38.0293 N; 9.0111W	Bom calibre; bom sabor; fáceis de colher.
AM11	38.2843 N; 9.114 W	Boa produção; bom calibre; fáceis de colher; bom sabor.
AM17	38.306 N; 9.1056 W	Bom calibre; bom sabor; ótima cor (muito branca).
AM19	38.309 N; 9.1056 W	Bom calibre; pouca produção; difíceis de colher; excelente sabor.

3.1.1. Preparação das sementes

Os três ensaios (ensaio 1, ensaio 2.1 e ensaio 2.2) iniciaram-se em datas distintas (Quadro 2): Ensaio 1- Efeito da escarificação química, giberelinas e estratificação (Quente e fria); Ensaio 2- Efeito das altas/baixas temperaturas na germinação de sementes de *C. album* (ensaio 2.1 – 60°C, 4° e 15°/2°C; ensaio 2.2 - 40°C, 4° e 15°/25°C)

Os frutos colhidos para o ensaio 1 foram acondicionados e mantidos à temperatura de 4°C durante quatro meses, antes de iniciar os pré-tratamentos. As sementes foram extraídas dos frutos, removendo manualmente toda a polpa e resíduos do fruto e colocadas em tabuleiros à temperatura ambiente para secarem. No ensaio 2.1, os frutos foram secos em estufa a 40°C durante duas semanas, a 60°C durante mais duas semanas e colocados em água a 14 de outubro. No dia 19 de outubro as sementes foram separadas dos restos dos frutos e colocadas em areia húmida para tratamento pelo frio (câmara frigorífica a 4°C). No ensaio 2.2, as sementes foram separadas dos frutos frescos e colocadas em estufa a 40°C durante quatro semanas, e de seguida colocadas em água, na câmara frigorífica, até o início do ensaio.

Todas as sementes foram desinfetadas em álcool etílico a 70% (v/v) durante cerca de cinco minutos, e depois em lixívia comercial durante 13 minutos. Por fim, as sementes foram lavadas em água corrente durante uma hora e colocadas nas caixas de Petri. As sementes foram divididas em placas de Petri (\varnothing 9 mm) com 25 sementes cada e pesadas (sementes húmidas), recorrendo a uma balança digital de precisão, registando-se o peso de cada lote de sementes. Em todas as placas de Petri foi colocado um papel de filtro (previamente esterilizado em autoclave) e humedecido com água esterilizada, e posteriormente distribuíram-se uniformemente as sementes no papel de filtro.

A posição das sementes pode causar diferenças percentuais na germinação. No ensaio as sementes foram colocadas todas na mesma posição (com a cicatriz micropilar em contacto com a superfície hidratada), para que esse parâmetro não influenciasse nos resultados.

3.1.2. Dimensão das sementes

Para a medição da dimensão das sementes, foram analisadas 20 sementes de cada genótipo, utilizando o software de processamento e análise de imagem Image-Pro® Plus. A cada semente foi medida o diâmetro menor, o diâmetro maior, respetiva média do diâmetro menor e maior e a área (Fig. 2).

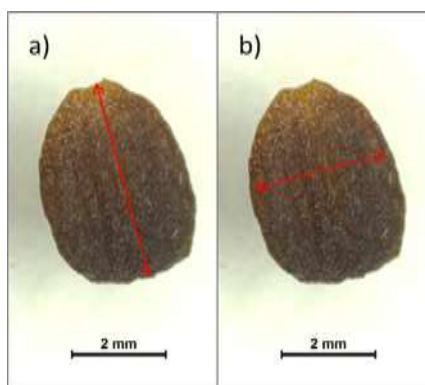


Figura 2 -Sementes de *C. album* fotografadas à lupa, indicando o diâmetro maior (a)) e diâmetro menor (b)).

Quadro 2 - Data de início dos tratamentos

Ensaio	Data de início dos tratamentos
Ensaio 1	03-12-2015
Ensaio 2.1	11-12-2015
Ensaio 2.2	11-12-2015

3.1.3. Tratamentos

3.1.3.1. Ensaio 1. Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação

As sementes do ensaio 1 foram divididas em oito lotes diferentes com quatro repetições de cada lote. Para avaliar os efeitos do pré-tratamento de escarificação e estratificação foi usado um total de 3200 sementes, 800 sementes de cada genótipo (AM8, AM11, AM17 e AM19), divididas em 8 modalidades distintas (T0, T1, F1, F2, G1, G2, G3 e G4) (Quadro 3).

As sementes de todos os tratamentos do ensaio 1 foram colocadas inicialmente em câmara de germinação (CG) à temperatura de 15/25 °C e fotoperíodo de 16 horas luz ($32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) / 8 horas de escuro e uma humidade relativa de 60% durante 12 semanas. Seguidamente, após 12 semanas, quatro modalidades de sementes (T1, F2, G2 e G4) sofrem um tratamento de frio, câmara frigorífica (CF) a 4/5 °C no escuro.

As sementes dos lotes F1, F2, G3 e G4 foram sujeitas a uma escarificação química, sendo colocadas em ácido sulfúrico concentrado (95-97%), num banho de gelo, durante 30 minutos, numa hotte química. Seguidamente foram lavadas em água corrente durante uma hora. Posteriormente, as sementes foram mantidas em contato com hipoclorito de cálcio (3 g/L) completamente dissolvido em água com hidróxido de cálcio (3 g/L), durante 30 minutos. Por fim, lavaram-se as sementes em água corrente, durante cinco minutos e foram colocadas nas placas de Petri, corretamente identificadas (genótipo, tratamento e nº de repetição). As sementes dos restantes lotes (T0, T1, G1 e G2) não sofreram qualquer tratamento de escarificação química.

As sementes dos lotes G1 + G2 + G3 + G4 foram submetidas a tratamento com uma solução de ácido giberélico (1000 ppm), > 93% de pureza (Duchefa®), durante 24 horas na ausência de luz, 169 dias após o início do ensaio.

Foram separados lotes de sementes com os diferentes tratamentos para serem analisadas ao nível histológico, em diferentes datas ao longo do ensaio (Quadro 6).

Quadro 3 -Tratamentos do ensaio 1. Com respectivas datas até ao final do ensaio

Modalidades		3 dezembro	25 fevereiro	19 maio	10 outubro
T0	S/ác	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
T1	S/ác	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
F1	C/ác	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
F2	C/ác	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
G1	S/ác + Ga ₃	12 semanas	12 semanas	22 semanas	
G2	S/ác + Ga ₃	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
G3	C/ác + Ga ₃	12 semanas	12 semanas	21 semanas	
G4	C/ác + Ga ₃	12 semanas	12 semanas	21 semanas	

Quente	- Câmara de crescimento à temperatura de 15/25 °C
Frio	- Câmara frigorífica a 4/5 °C no escuro

Modalidades:

T0 - Sementes provenientes da planta sem qualquer tratamento de escarificação, apenas desinfetadas e mantidas a mantidas em CG (câmara de germinação) durante 45 semanas.

T1 - Sementes provenientes da planta sem qualquer tratamento de escarificação, apenas desinfetadas e mantidas a em CG durante 12 semanas. Após este período as sementes são colocadas durante 12 semanas CF e recolocadas na CG durante mais 21 semanas.

F1 - Sementes provenientes da planta com escarificação de 30 minutos em ácido sulfúrico são mantidas em CG durante todo o ensaio.

F2 - Sementes provenientes da planta são colocadas em CG durante 12 semanas. As sementes são colocadas em CF durante 12 semanas e recolocadas em CG durante mais 21 semanas.

G1 - As sementes sofreram o mesmo tratamento que T0, mas foram tratadas com GA₃ no segundo período de permanência em CG e até ao fim do ensaio.

G2 - As sementes sofreram o mesmo tratamento que T1, mas foram tratadas com GA₃ no segundo período de permanência em CG e até ao fim do ensaio.

G3 - As sementes sofreram o mesmo tratamento que F1, mas foram tratadas com GA₃ no segundo período de permanência em CG e até ao fim do ensaio.

G4 - As sementes sofreram o mesmo tratamento que F2, mas foram tratadas com GA₃ no segundo período de permanência em CG e até ao fim do ensaio.

3.1.3.2. Ensaio 2. Efeito de diferentes ciclos de alta/baixa temperatura

As sementes, no ensaio 2, sofreram estratificação quente e fria antes da desinfecção, tendo-se realizado dois ensaios em que as sementes não foram submetidas a nenhum tratamento de escarificação química.

Ensaio 2.1- Temperatura de 60°,4°e 25°/15°C

Neste ensaio (Quadro 4) foram utilizados apenas três genótipos provenientes da Aldeia do Meco (AM8, AM11 e AM19). Os frutos secos (colhidos em agosto de 2015) foram colocados em estufa a 40°C durante duas semanas e a 60°C durante mais duas semanas sendo posteriormente colocadas em água destilada a 14 de outubro. No dia 19 de outubro as sementes foram separadas dos restos dos frutos e colocadas em areia húmida para se proceder ao tratamento de frio, câmara frigorífica (CF) a 4/5 °C no escuro.

Quadro 4 - Tratamentos efetuados no ensaio 2.1, com respetivas datas. Neste ensaio utilizaram-se 4 genótipos (AM8, AM11 e AM19) e as sementes não foram submetidas a tratamentos de escarificação química.

Modalidades	11 dez.	08 jan.	05 fev.	04 mar.	01 abr.	29 abr.	27 mai.	24 jun.	22 out.
X0	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	
X1	4 sem	4 sem							
X2	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem					
X3	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem			

Sementes secas	- Câmara de secagem à temperatura de 40/60°C
Sementes hidratadas	- Câmara frigorífica a 4/5°C no escuro
Sementes hidratadas	- Câmara de crescimento à temperatura de 15/25°C

Modalidades:

X0 – As sementes pré tratadas (60°C) e mantidas em CF durante 8 semanas foram colocadas em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia, sofrendo de seguida três ciclos de altas temperaturas (60°C)

X1 - As sementes pré tratadas (60°C) e mantidas em CF durante 8 semanas, foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia, em seguida foram submetidas a temperatura de 40/60°C durante 4 semanas e depois colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia até ao fim do ensaio.

X2 - As sementes pré tratadas (60°C) foram mantidas em CF durante 8 semanas período após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia durante 4 semanas. Após este período foram submetidas a temperatura de 40/60°C durante 4 semanas após o qual são colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C durante 4 semanas. Voltaram a ser mantidas em CF durante 8 semanas período após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia até ao final do ensaio.

X3 - As sementes pré tratadas (60 °C) foram mantidas em CF durante 8 semanas período após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia durante 4 semanas. Após este período foram submetidas a temperatura de 40/60°C durante 4 semanas após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C durante 4 semanas. Voltaram a ser mantidas em CF durante 4 semanas período após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia. Após este período foram submetidas a temperatura de 40/60°C durante 4 semanas após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C até ao final do ensaio.

Ensaio 2.2- Temperatura de 40°, 4°e 25°/15°C

No ensaio 2.2 foram separadas sementes de frutos frescos (colhidos em agosto de 2015) que foram colocados em estufa a 40 °C durante quatro semanas, seguidamente foram colocadas em água destilada para posteriormente iniciar os tratamentos (Quadro 5).

Foram utilizados quatro génotipos, AM8, AM11, AM17 e AM19 da Aldeia do Meco.

Quadro 5 - Tratamento de sementes no ensaio 2.2, com as respectivas datas. Neste ensaio utilizaram-se 4 genótipos (AM8, AM11, AM17 e AM19) e as sementes não foram submetidas a tratamentos de escarificação química.

Modalidades	11 dez.	08 jan.	05 fev.	04 mar.	01 abr.	29 abr.	27 mai.	24 jun.	22 jul.	19 ago.	16 set.	22 out.
Z0	4 sem	4 sem										
Z1	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem								
Z2	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem						
Z3	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem	4 sem				

Sementes secas	- Câmara de secagem à temperatura de 40 °C
Sementes hidratadas	- Câmara de crescimento à temperatura de 15/25 °C
Sementes hidratadas	- Câmara frigorífica a 4/5 °C no escuro

Modalidades:

Z0 – As sementes foram mantidas a 40°C durante 4 semanas e em CF novamente durante 4 semanas. Posteriormente são colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia durante todo o ensaio.

Z1 – As sementes foram mantidas a 40°C durante 4 semanas e em CF novamente durante 4 semanas. Posteriormente foram colocadas em CG (4 semanas) à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia durante todo o ensaio, em seguida foram submetidas a temperatura de 40°C durante 4 semanas e por fim colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25 °C e fotoperíodo de 16/8 horas dia até ao fim do ensaio.

Z2 – As sementes foram mantidas a 40°C durante 4 semanas e em CF durante novamente 4 semanas. Posteriormente foram colocadas em CG (4 semanas) à temperatura de 15/25 °C e fotoperíodo de 16/8 horas em seguida submetidas a temperatura de 40°C durante 4 semanas e novamente 4 semanas em CG à temperatura de 15/25 °C e fotoperíodo de 16/8 horas. Após este período foram novamente mantidas em CF durante 4 semanas, após as quais foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia até ao final do ensaio.

Z3 – As sementes foram mantidas a 40°C durante 4 semanas e em CF durante novamente 4 semanas período após o qual foram para a CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8

horas dia durante 4 semanas. Após este período foram submetidas a temperatura de 40°C durante 4 semanas após o qual foram colocadas em CG à temperatura de 15/25°C durante 4 semanas. Foram novamente mantidas em CF durante 4 semanas período após o qual foram colocadas em CG à temperatura de 15/25°C e fotoperíodo de 16/8 horas dia. Após este período foram submetidas a temperatura de 40°C durante 4 semanas após o qual foram colocadas a germinar em CG à temperatura de 15/25°C até ao final do ensaio.

3.1.4. Monitorização

Durante todo o ensaio os níveis de humidade das placas de Petri foram controlados, colocando, sempre que necessário, água esterilizada no interior das placas. Para o controlo de possíveis fungos, procedemos ao tratamento com fungicida Previcur® N (solução concentrada com 722 g/l ou 66,5% (p/p) de propamocarbe). Ao terceiro mês do ensaio, as sementes foram pulverizadas com Previcur® energy (Solução concentrada com 31 g/l ou 27,68% (p/p) de fosetil, na forma de sal de sódio, e 530g/l ou 47,32% (p/p) de propamocarbe, na forma de hidrocloreto), até terminar o ensaio. Foi necessário, para controlo de algas, a partir do dia 26 de fevereiro, desligar as luzes da câmara de germinação. No decorrer do ensaio foram mudados os papéis de filtro das placas, para evitar o aparecimento de fungos.

3.1.5. Contagens

Durante os meses em que decorreu o ensaio, de 15 em 15 dias foram contabilizadas o número de sementes germinadas e sementes com quebra do episperma em cada placa e retiradas as que se encontravam com um comprimento radicular superior a 1 mm. As contagens foram efetuadas em todos os ensaios.

No ensaio 1, quando terminado, fez-se a contagem do número de sementes com embrião necrosado e embrião decomposto, por caixa de Petri, com o objetivo de analisar a percentagem de sementes germinadas sem contabilizar as que se encontravam com embriões decompostos ou necrosados.

Para a análise e quantificação da germinação do ensaio, os resultados foram expressos em:

- Percentagem de Sementes com Rutura do Episperma

$$\frac{\text{N.º Total de Sementes com Rutura do Episperma}}{\text{N.º Total de Sementes}} \times 100$$

- Percentagem de Sementes germinadas

$$\frac{\text{N.}^{\circ} \text{ Total de Sementes com Radícula}}{\text{N.}^{\circ} \text{ Total de Sementes}} \times 100$$

- Percentagem de sementes germinadas com as sementes com embriões decompostos e necrosados, retiradas

$$\frac{\text{N.}^{\circ} \text{ Total de Sementes com Radícula}}{\text{N.}^{\circ} \text{ Total de Sementes} - \text{N.}^{\circ} \text{ Sementes com embrião necrosado ou decomposto}} \times 100$$

3.2. Delineamento experimental e tratamento estatístico dos dados

Para avaliação dos diâmetros, peso e área das sementes, fez-se uma análise de variância (ANOVA) a um fator: genótipo. Realizou-se um teste de comparação de Tukey com $\alpha < 0,05$.

Os ensaios, para analisar a percentagem de germinação, seguiram um delineamento fatorial a dois fatores:

Ensaio 1: os ensaios foram conduzidos num delineamento fatorial a dois fatores: genótipo e tratamento, com quatro repetições por modalidade (cada unidade experimental constituída por uma placa de Petri com 25 sementes). O fator genótipo tem 4 níveis (AM8, AM11, AM17 e AM19) da Aldeia do Meco e o fator tratamento tem 8 níveis (T0, T1, F1, F2, G1, G2, G3 e G4).

Ensaio 2.2: O ensaio seguiu um delineamento fatorial a dois fatores: genótipo e tratamento, com quatro repetições por modalidade (cada unidade experimental constituída por uma placa de Petri com 25 sementes). O fator genótipo tem 4 níveis (AM8, AM11, AM17 e AM19), todos provenientes da Aldeia do Meco. O fator tratamento tem 4 níveis (Z0, Z1, Z2 e Z3)

Para a percentagem de sementes germinadas realizou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk e nos casos em que os pressupostos de distribuição normal não se verificaram, os dados foram transformados:

$$\text{arcseno}\left(\left(\sqrt{\frac{x}{100}}\right)\right)$$

onde,

x= percentagem de sementes germinadas, com radícula >1 mm

Efetuuou-se uma análise de variância (ANOVA) e comparações múltiplas das médias pelo teste de Tukey, com $\alpha < 0,05$.

A análise estatística foi efetuada com recurso ao programa Statistix 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, Florida)

3.3. Observações histológicas

3.3.1. Colheita de material vegetal e fixação

No decorrer no ensaio 1, foram colhidas amostras de sementes, ao fim de cada ciclo de temperaturas, para os embriões das sementes serem analisados ao nível histológico (Quadro 6). As amostras recolhidas (10 sementes de cada tratamento em cada análise) encontravam-se em caixas de Petri separadas do ensaio, para não interferir com a contagem de sementes germinadas.

As datas de colheita foram escolhidas de acordo com os tratamentos até então. A primeira colheita procedeu-se antes da colocação do ensaio em câmara de germinação, a segunda colheita após as modalidades terem sofrido estratificação fria e quente ou apenas estratificação quente, por fim, a terceira análise quando o ensaio terminou.

No presente ensaio, fizeram-se adaptações metodológicas até conseguir otimizar o processo de corte das sementes de *C. album*.

Quadro 6 - Data de colheita de sementes de camarinha para análise

	1ª Análise	2ª Análise	3ª Análise
Data	03-12-2015	19-05-2016	10-10-2016

Protocolos

Os protocolos histológicos, usando a parafina como meio de inclusão, dividem-se em quatro fases: Fixação, desidratação clarificação e inclusão:

Fixação:

O objetivo da fixação é preservar a estrutura celular. Através de técnicas de fixação, os tecidos são mortos por imersão numa solução que inibe os seus processos vitais, prevenindo alterações nas suas propriedades físicas (Valdivieso, 1991)

Desidratação:

A desidratação é um processo preparatório dos tecidos, para, de seguida, iniciar a inclusão. Consiste na remoção do fixador e da água dos tecidos, substituindo-os pelo líquido desidratador. Para minimizar a distorção do tecido a partir de correntes de difusão, as amostras são gradualmente desidratadas por uma substância solúvel no material de inclusão (Valdivieso, 1991).

Clarificação:

A clarificação substitui o fluido de desidratação por um líquido que é tanto miscível com o fluido de desidratação como com o meio de inclusão. A escolha de um agente de clarificação depende do tipo de tecidos a processar, o meio de montagem a ser utilizado, fatores de segurança, custo e dano mínimo dos tecidos (Jensen, 1962). As substâncias de clarificação mais usadas são o xilol, o Histoclear™ e o clorofórmio.

Inclusão:

É o processo pelo qual os tecidos são impregnados por um meio que ao solidificar vai proporcionar suporte suficiente para a realização dos cortes histológicos.

Testaram-se quatro genótipos para efetuar os cortes histológicos das sementes. A diferença entre eles residiu no tempo de desidratação e no processo de clarificação. Apresenta-se o protocolo que conduziu a melhores resultados (protocolo 4), os restantes protocolos (protocolo 1, 2 e 3, encontram-se no anexo I)

Protocolo 4

Anteriormente à fixação, como efetuado no protocolo anterior, as sementes foram abertas e retirados os embriões, para de seguida proceder à sua hidratação, durante 48 horas. No presente protocolo, em todos os procedimentos efetuados (fixação, desidratação, clarificação e inclusão) foi utilizado o vácuo, durante 5/7 segundos em cada fase do protocolo histológico.

Fixação

O fixador foi F.A.A. mas para assegurar a sua eficiente penetração utilizou-se o vácuo. Após fixação (durante 48 horas), as sementes foram desidratadas.

Desidratação

Utilizou-se a seguinte serie de desidratação, constituída por crescentes concentrações de etanol desde os 70% ao absoluto:

- (a) Etanol 70%: 1 hora
- (b) Etanol 80%: 1 hora
- (c) Etanol 96%: 1 hora
- (d) Etanol 100%: 2 horas

Clarificação

Neste protocolo, após várias pesquisas, decidiu-se utilizar o clorofórmio como substância de clarificação, uma vez que degrada de uma forma mais rápida os lípidos contidos na semente de camarinha. (adaptado: Willard, 1890). A clarificação, neste protocolo foi feito de forma mais celebre. Frascos com igual quantidade de etanol absoluto e clorofórmio durante duas horas com utilização de vácuo várias vezes durante as duas horas. Imergiu-se, de seguida, os embriões das sementes para um frasco com clorofórmio puro, onde se mantiveram durante 2 horas, também com a utilização intervalada de vácuo.

Inclusão

A inclusão foi feita de forma bastante progressiva. Após a clarificação, emergiu-se o material já desidratado na parafina liquida, que se encontrava em frascos de vidro. De seguida, para assegurar a infiltração de parafina nas sementes, colocam-se os frascos numa estufa a cerca de 60 °C, durante, pelo menos 16 horas (overnight).

3.3.2. Inclusão e Montagem em blocos de parafina

Em todos os protocolos, a seguir a estas quatro etapas acima descritas, procedeu-se da mesma forma. O material foi montado com a orientação pretendida, em moldes metálicos contendo parafina liquida. Após a solidificação da parafina, retiram-se os blocos de parafina e com o auxílio do bisturi retirou-se a parafina em excesso para facilitar nos cortes do embrião.

3.3.3. Cortes histológicos

Os cortes efetuaram-se num micrótomo rotativo da Leica RM 2255, com a espessura de 7 µm utilizando facas descartáveis Leica Premium Surgipath®DB80 series.

Na montagem utilizou-se o adesivo de Haupt's e colocaram-se os cortes sobre uma película de água nas lâminas que se encontram dispostas numa placa de aquecimento, para a parafina derreter e evaporar a água utilizada, esticando os cortes (Valdivieso, 1991).

3.3.4. Coloração

Após a realização dos cortes histológicos e desparafinação dos mesmos, foram corados para distinção dos diferentes tipos de células/tecidos e posterior observação em microscopia ótica.

Os cortes foram então desparafinados e corados com a seguinte sequência:

- a) Duas passagens de 10 minutos em Histoclear, sendo a segunda para eliminar a restante parafina das lâminas,
- b) Duas passagens de 10 minutos etanol absoluto, sendo a primeira para eliminar os resíduos do Histoclear,
- c) 5 minutos em etanol 96%,
- d) 5 minutos com solução de *Astra Blue*,
- e) Diferenciação em etanol a 96% durante alguns minutos para eliminar o excesso de corante.

Utilizou-se a coloração *Astra blue*, uma vez que consegue diferenciar células mortas de células vivas.

3.3.5. Observações Microscópicas

As lâminas com os cortes foram retiradas do etanol a 96% e secas à temperatura ambiente, procedendo-se às montagens permanentes com Euparal como meio de montagem entre a lâmina e a lamela.

Por fim, procedeu-se à observação dos cortes obtidos em lupa (Leica DMA 1000) (Fig.3). A aquisição da imagem foi realizada com o programa Leica Application Suite (LAS) version 4.4.0.

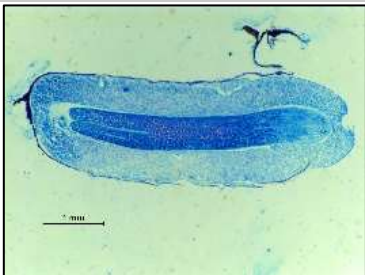
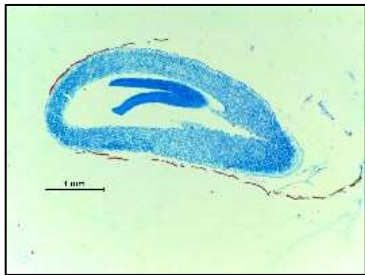
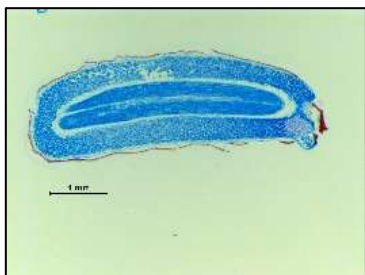
Para além da observação microscópica dos cortes histológicos, foram também observados todos os embriões das sementes no final do ensaio. O pericarpo das sementes foi aberto com o bisturi, e delicadamente cortou-se o endosperma para retirar o embrião. Estes embriões foram devidamente observados e classificados num grau de 1 a 3, correspondendo o grau 1 ao embrião num estado menos avançado de desenvolvimento e o grau 3 ao embrião mais desenvolvido (Quadro 7).

Uma vez que os frutos observados se encontravam armazenados em câmara frigorífica desde agosto de 2015, foram colhidos e observados (em outubro de 2016) sementes deste fruto para verificar a maturação do embrião aquando da maturação do fruto.



Figura 3 - Lupa (Leica DMA 1000). A aquisição da imagem foi realizada com o programa Leica Application Suite (LAS) version 4.4.0.

Quadro 7 - Níveis de desenvolvimento de embriões de *C. album*, visualizados através de cortes histológicos do embrião em lupa (Leica DMA 1000).

Níveis de desenvolvimento	Cortes de embriões de sementes de <i>C. album</i>
<p>1</p> <p>Cotilédones formados menores que $\frac{1}{2}$ do embrião</p>	
<p>2</p> <p>Cotilédones formados com tamanho superior a $\frac{1}{2}$ do embrião</p>	
<p>3</p> <p>Cotilédones formados e hipocótilo evidente</p>	

4. Resultados e Discussão

4.1. Características das sementes utilizadas no ensaio

Foram avaliadas a área, o diâmetro, e o peso de sementes de bagas brancas colhidas em 2015, provenientes da Aldeia do Meco, de quatro genótipos distintos (AM8, AM11, AM17 e AM19) (Quadro 8). Constatou-se que existem diferenças significativas ($p < 0,001$) em todas as diferentes dimensões das sementes.

Quadro 8 - Características (área, diâmetro maior, diâmetro menor e diâmetro médio) de sementes secas extraídas de bagas brancas, de quatro genótipos diferentes, todos provenientes da Aldeia do Meco

Genótipo	Diâmetro maior (mm)	Diâmetro menor (mm)	Área (mm ²)	Peso (mg)
AM8	3,9 C	3,1 C	9,9 C	12,1 D
AM11	4,2 B	3,4 C	11,7 B	15,0 C
AM17	4,1 B	3,4 AB	11,7 B	16,2 B
AM19	4,6 A	3,6 A	13,6 A	19,6 A
Prob(F)	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
EP	0,075	0,076	0,42	0,16

Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha = 0,05$, em que letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes; EP– Erro padrão da média; N = 20 sementes por genótipo

Relativamente ao peso das sementes, Oliveira & Dale (2012), constataram que os pesos das sementes variam significativamente entre os locais, quanto mais a norte menor é o peso das sementes. No presente ensaio verificou-se que sementes provenientes do mesmo local variam de peso, consoante o genótipo (Quadro 8). As sementes do genótipo AM19 apresentam um peso significativamente superior aos restantes genótipos, enquanto o genótipo AM8 apresenta o menor peso.

Comparando as restantes dimensões (diâmetro maior, menor e área) constata-se que AM19 é o genótipo com valores significativamente mais elevados (área: 13,65 mm², diâmetro maior médio: 4,6 mm, diâmetro menor médio: 3,6 mm e peso: 19,6 mg), comparativamente com os restantes, sendo AM11 e AM17, sementes com diâmetro e área com valores intermédios e AM8, as sementes com menores dimensões (área: 9,92 mm², diâmetro maior médio: 3,9 mm e diâmetro menor médio: 3,1 mm e peso: 12,1 mg).

Comparando os valores da área com Santos (2013) observa-se que o genótipo utilizado nesse estudo foi o de menor dimensões, uma vez que a área das sementes da Aldeia do Meco foi de 9.0 mm², próximo dos valores do genótipo AM8.

De acordo com Clavijo *et al.*, (2003) e Santos, (2013), os valores mais baixos de área (no estudo referem-se a sementes de Aldeia do Meco, São Pedro de Moel e Quiaios) são devido ao facto das populações de onde provêm as sementes terem grande competição com pinheiros, fazendo com que estas populações de *C. album* invistam grande parte dos seus recursos no crescimento e manutenção, deixando muito pouco disponível para a reprodução. No entanto, neste estudo verificou-se que existe uma diferença significativa na área da semente em função do genótipo (Quadro 8).

Tendo em conta os valores observados neste estudo relativos ao diâmetro, estes vão ao encontro dos observados por Calviño-Cancela, (2005) que refere no seu estudo um diâmetro médio maior de 3,78 mm e menor de 2,90 mm para as sementes de *C. album*. Fedriani & Delibes (2009) observaram o valor de 3,39 mm para o diâmetro médio de sementes desta espécie, provenientes de Doñana (Espanha) e Larrinaga (2010) verificou um diâmetro médio maior e menor de sementes desta espécie, provenientes de Camariñas (Espanha), de 3,75 mm e 2,81 mm, respetivamente e Santos, (2013), com um diâmetro médio maior de 3.38 mm e diâmetro médio menor de 2,9 mm.

4.2. Germinação das sementes

Um endocarpo lenhificado, como é o caso da semente de *C. album* pode ser impermeável à água, impedindo a embebição e assim a germinação da semente. Algumas sementes com endocarpo lenhificado germinam bem após a estratificação a frio, outras sementes requerem um período de estratificação quente seguido por um período de estratificação a frio antes de germinarem.

A zona de união dos tegumentos do óvulo denominada micrópilo permanece ao longo da formação e desenvolvimento da semente, em algumas espécies, deixando uma cicatriz de dimensões variáveis. Esta é geralmente a região de maior permeabilidade da semente, permitindo a entrada de água durante a embebição e as trocas gasosas efetuadas durante o processo de germinação. Ao fotografar as sementes de *C. album* à lupa, observámos que estas apresentam uma cicatriz micropilar de grandes dimensões (Fig.4). A grande dimensão deste orifício sugere uma facilidade da entrada de água e trocas gasosas na semente.



Figura 4 -Localização da cicatriz micropilar (seta) que permite a entrada de água e trocas gasosas no tegumento da semente de *Corema album*

Foram estabelecidas quatro fases de desenvolvimento da germinação da semente (Fig. 5):

- a) Embrião+endosperma sem iniciação evidente da germinação;
- b) Embrião germinado;
- c) Embrião germinado com mudança de tonalidade-formação das primeiras folhas;
- d) Fase mais desenvolvida do embrião germinado.

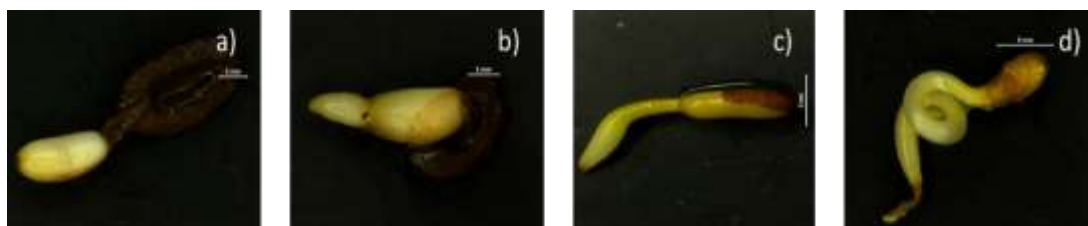


Figura 5 - Fases de desenvolvimento da germinação da semente de *C. album*, sem episperma.

4.2.1. Ensaio 1. Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação

A quebra do episperma (Fig.6), teve início 96 dias após o início do ensaio, nas sementes que foram submetidas a escarificação química, à exceção do genótipo AM19, que iniciou a quebra do episperma na modalidade T0 (Fig.7, 8, 9 e 10).



Figura 6 - Semente de *C. album* com episperma quebrado, obtido através da lupa (Leica DMA 1000).

O genótipo AM8 (Fig.7), para além de iniciar a quebra do episperma das sementes em mais modalidades, aos 96 dias, também foi a que obteve uma maior taxa de sementes com episperma quebrado (92% nas sementes com estratificação fria e quente e borrifadas com GA₃).

Nas modalidades que foram submetidas ao tratamento com GA₃, verifica-se um acentuado aumento de quebra do episperma, aos 183 dias após o início do ensaio. O que provavelmente foi devido à aplicação de GA₃ aos 169 dias após o início do ensaio. Essa observação sugere que as giberelinas promovem o crescimento do embrião e consequentemente a quebra do episperma.

O ácido sulfúrico danificou muitos embriões das sementes dos genótipos AM11, AM17 e AM19, à exceção do AM8, concluindo-se que este genótipo é o mais resistente à ação do ácido.

Nos gráficos da Fig.8 e Fig.9, relativos a sementes do genótipo AM11 e AM17, respetivamente, seguem crescimentos semelhantes, sendo os tratamentos G1, G2 e T0, com maior taxa de quebra do episperma.

As sementes sem qualquer tratamento tiveram uma percentagem de quebra de episperma semelhante em todos os genótipos, sendo 42% a menor (AM8) e 58% a percentagem mais elevada, no genótipo AM19 (Fig.10).

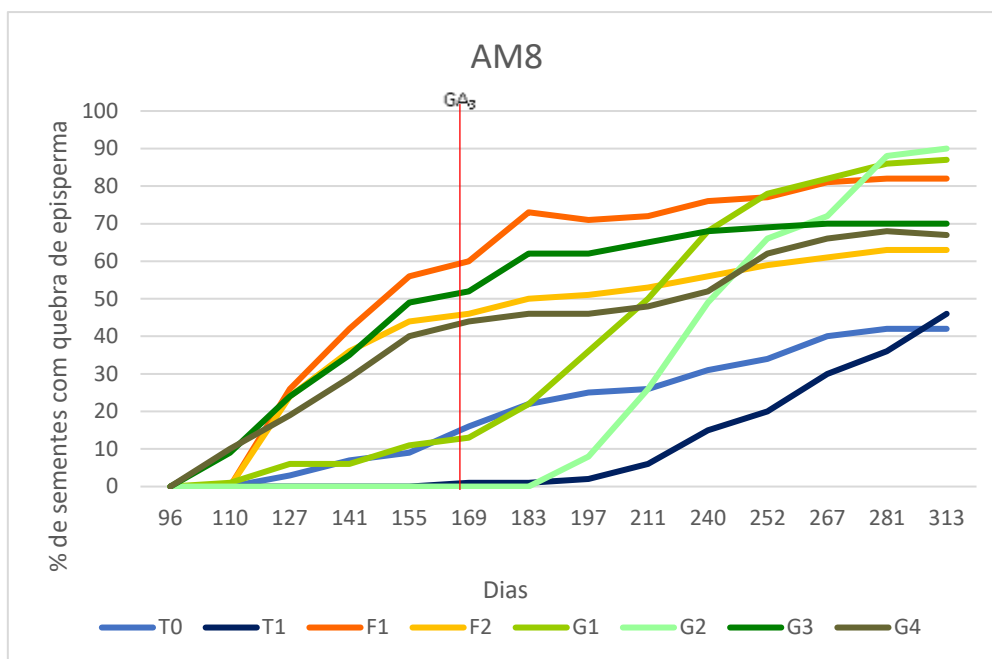


Figura 7 –Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM8. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).

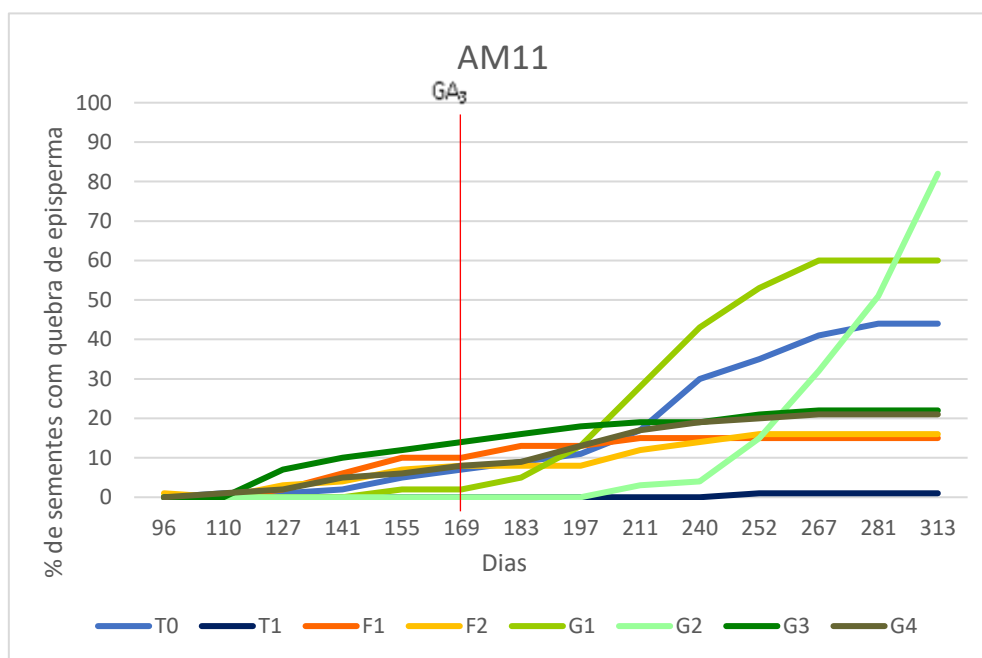


Figura 8- Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM11. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).

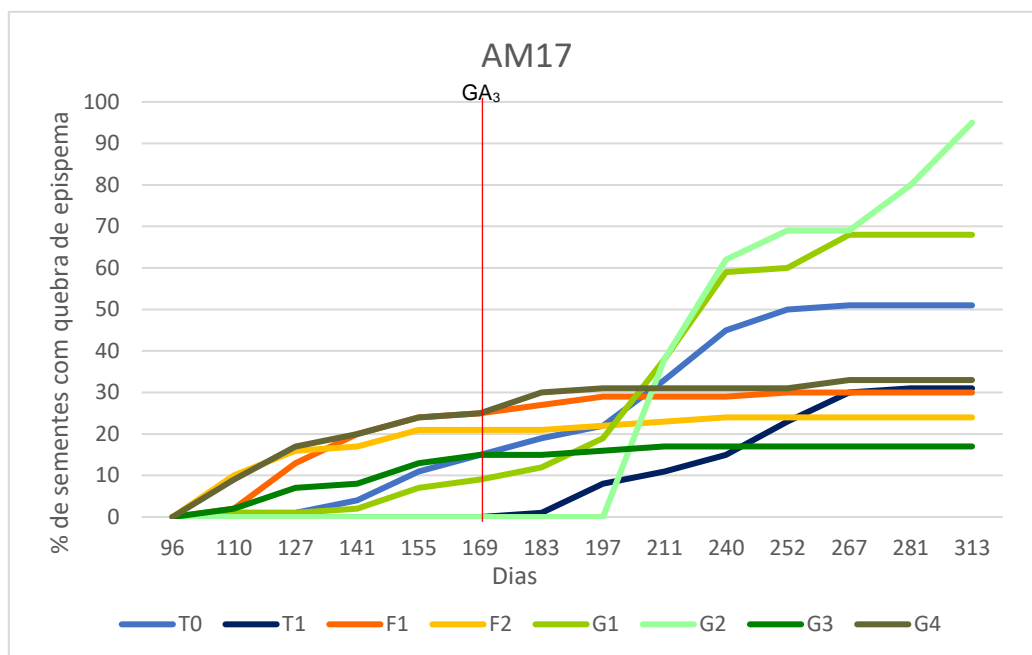


Figura 9 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM17. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).

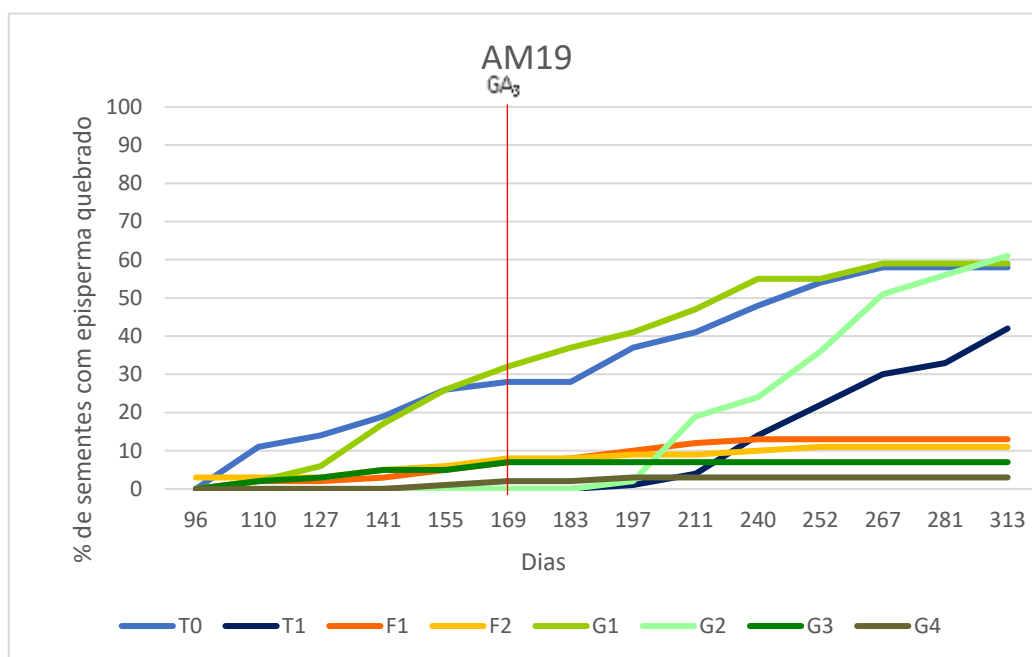


Figura 10 - Efeito dos diferentes tratamentos na percentagem média (acumulada) de quebra do episperma de sementes do genótipo AM19. (N=4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por modalidade).

Relativamente à percentagem média de sementes germinadas (radícula ≥ 1 mm), esta diferiu significativamente entre os genótipos, tratamentos e respetiva interação ($p < 0,001$) após 313 dias (Quadro 9).

O genótipo AM19 foi o que teve uma percentagem de germinação menor, principalmente nas modalidades submetidas ao tratamento com ácido sulfúrico. Observação que nos permite concluir que o genótipo AM19 quebra com mais facilidade a soldadura das valvas (genótipo com maior percentagem de sementes com episperma quebrado), o que provavelmente proporcionou a entrada de ácido no embrião e posterior destruição do mesmo (Fig.11)

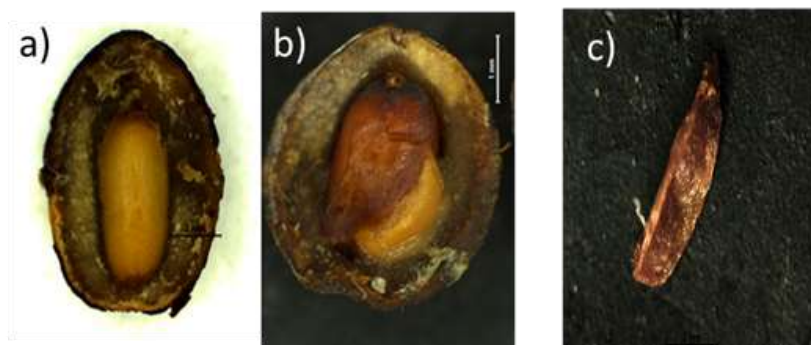


Figura 11 - Semente de *C. album* aberta (apenas com uma valva), com embrião+endosperma e perisperma, obtido em lupa (Leica DMA 1000). a) semente de *C. album* saudável; b) Semente de *C. album* com embrião decomposto; c) embrião necrosado de *C. album*.

Quadro 9 - Percentagem de germinação dos quatro genótipos em cada tratamento do ensaio 1- Efeito dos pré-tratamentos e escarificação química na germinação.

Genótipo	Tratamento	% Germinação
AM8	T0	25,0 CDEFG
	T1	16,0 CDEFGH
	F1	53,0 AB
	F2	30,0 BCDE
	G1	51,0 AB
	G2	66,0 A
	G3	51,0 AB
	G4	52,0 AB
AM11	T0	25,0 CDEFGH
	T1	9,0 EFGH
	F1	10,0 EFGH
	F2	2,0 GH
	G1	15,0 CDEFGH
	G2	51,0 AB
	G3	7,0 EFGH
	G4	6,0 FGH
AM17	T0	21,0 CDEFGH
	T1	16,0 CDEFGH
	F1	11,0 EFGH
	F2	17,0 CDEFGH
	G1	13,0 DEFGH
	G2	38,0 CDEFGH
	G3	2,0 GH
	G4	10,0 EFGH
AM19	T0	35,0 BCD
	T1	10,0 EFGH
	F1	6,0 FGH
	F2	2,0 GH
	G1	4,0 FGH
	G2	26,0 CDEF
	G3	3,0 FGH
	G4	0,0 H
Prob(F)		
Genótipo		<0,001
Tratamento		<0,001
Genótipo x Tratamento		<0,001

Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha \leq 0,05$, em que letras diferentes em coluna ou linha indicam valores estatisticamente diferentes; N = 4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por tratamento em todos os genótipos.

Verificou-se que o genótipo AM8 foi o que obteve uma maior percentagem de germinação média em quase todos os tratamentos (43,0%), o que sugere que sementes mais pequenas terão provavelmente uma maior taxa de germinação.

As sementes do genótipo AM19 foram as que obtiveram uma menor percentagem germinativa (10,7%), o que se conclui que sementes de menores dimensões têm maior capacidade germinativa, uma vez que o genótipo AM19 é o que tem as sementes de maior dimensão e peso (Quadro 8). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Santos (2013) que verificou que sementes de *C. album* de menor peso apresentam uma maior taxa de germinação.

Contrariamente ao observado, Propiginis (1985) diz que a dimensão das sementes é um bom indicador da sua capacidade germinativa. Assim, dentro do mesmo lote, as sementes mais pequenas apresentam um menor poder germinativo comparativamente com as sementes de tamanho médio ou grande.

Nos resultados obtidos por Costa (2011) que aponta para o facto das sementes de *C. album* de Pinheiro da Cruz, no seu estudo, apresentarem maiores dimensões que as de bagas no mesmo estágio de maturação da Fonte da Telha, podendo indicar maior viabilidade e capacidade de germinação das primeiras, uma vez que, e segundo Propiginis, (1985), sementes maiores e mais pesadas têm maior quantidade de endosperma.

Observou-se que a maior percentagem de germinação absoluta foi de 66%, em G2, sementes sem qualquer tratamento de escarificação, apenas desinfetadas e mantidas em CG durante 12 semanas. Após este período as sementes foram colocadas durante 12 semanas em CF, seguidamente com GA₃ (1000ppm) e, por fim, recolocadas na CG durante mais 21 semanas (Quadro 9). Este tratamento, no entanto, não é significativamente diferente de F1 com 53% de sementes germinadas, G4 (52% de sementes germinadas), G1 (51% de sementes germinadas) e G3 (51% de germinações) do mesmo genótipo nem de G2 do genótipo AM11 (51% de sementes germinadas).

A percentagem de germinação das sementes da modalidade F2 (apenas sofreram escarificação química e estratificação quente e fria), do genótipo AM8, T0 (sementes sem qualquer tratamento) do genótipo AM19 e da modalidade G2 do genótipo AM17, consideram-se iguais, relativamente às modalidades F1, G4, G1 e G3 do genótipo AM8 e G2 do AM19.

A modalidade T0 (AM19) e F2 (AM8), não são significativamente diferentes de T1 (sementes apenas com estratificação fria e quente), com a percentagem média de germinação 16% e G1 (AM11 e AM17), com a percentagem de germinação de 15% e 13%, respetivamente. À semelhança da percentagem de germinação média dos genótipos com os tratamentos referidos, está também o tratamento T0 dos genótipos AM11 (25%), AM8 (25%) e AM17 (21%), o tratamento G2 do genótipo AM19 (26%) e, por fim o tratamento F2 com o genótipo AM17 (17%).

A menor percentagem de germinação média pertence ao tratamento G4 (AM19) com 0% de sementes germinadas.

Observou-se que 12 semanas de estratificação quente mais 12 semanas de estratificação fria, seguidas da aplicação de giberelinas (GA_3) e posterior estratificação quente (tratamento G2) é o procedimento que obteve maior percentagem de germinação em todos os genótipos, à exceção do AM19. De salientar que, apesar de, no genótipo AM19, o tratamento com maior percentagem de germinação ser T0, G2 obteve o segundo tratamento com mais sementes germinadas desse genótipo.

A combinação da estratificação quente seguida de outra fria permite confirmar a dormência fisiológica das sementes, uma vez que está documentado que este procedimento é o melhor para a quebra deste tipo de dormência (Nikolaeva, 1969 citada por Baskin & Baskin, 2001). O efeito promotor das giberelinas na germinação observado revela que a dormência pode ser o resultado do balanço hormonal entre promotores e inibidores de crescimento, e que a quebra de dormência e germinação pode estar relacionada a atuação do ácido giberélico.

A conjugação de escarificação química, seguida de estratificação quente e posterior estratificação fria está descrita como necessária a alguns géneros por forma a facilitar a quebra da dormência morfofisiológica de sementes com embriões pequenos e não desenvolvidos (Baskin, *et al.* 2002) concluindo-se que provavelmente as sementes de *C. album* não têm dormência morfofisiológica, uma vez que as sementes com esses tratamentos tiveram a percentagem de germinação muito baixa.

A percentagem de germinação das sementes sujeitas a escarificação química de 30 minutos (F1, F2, G3 e G4) foi bastante baixa. As sementes da modalidade F2 (sujeitas a escarificação química e CF durante 12 semanas) foram, deste grupo de modalidades, a que obteve menor taxa de germinação. Estes resultados podem ter sido devidos à baixa viabilidade das sementes posteriormente ao pré-tratamento, uma vez que a escarificação excessiva da semente pode ter levado à destruição de tecidos do embrião (Traveset *et al.*, 2008).

No genótipo AM19 (Quadro 9) as modalidades que sofreram escarificação química têm uma taxa de germinação diminuta (F1=6%; F2= 2%; G3=3%; G4=0%). Isto sugere que os genótipos de *C. album* reagem de forma diferente ao tratamento com ácido, uma vez que no genótipo AM8, a percentagem de germinação, nas mesmas modalidades, teve uma percentagem de germinação média muito superior. Estes resultados sugerem que a aplicação de ácido sulfúrico danificou as sementes do genótipo AM19.

O efeito do ácido sulfúrico na quebra de dormência e promoção da germinação de sementes foi verificadas por vários autores. No entanto foram utilizados diferentes tempos de imersão das sementes em ácido sulfúrico, 30 minutos (Capelanes, 1991), 20 minutos (Guerra *et al.*, 1982) e 4, 6 e 8 minutos (Bianchetti & Ramos, 1981). Santos (2013), observou que a duração de 30 minutos do pré-tratamento de escarificação química nas sementes provenientes da Aldeia do Meco 2011 foi superior à percentagem obtida para as sementes sem qualquer pré-tratamento. Neste ensaio observou-se que a taxa de germinação com escarificação química varia com o genótipo.

Analizando os dados, retirando da contagem todas as sementes danificadas (com embriões decompostos ou necrosados), obteve-se uma taxa de germinação bastante superior (Quadro 10). Desta forma, a taxa de germinação aumentou de 45,2% para 86,9%, no caso das sementes que foram borrifadas com GA₃ e que sofreram oscilações de temperatura de 4°C a 25°C (G2), conseguindo no genótipo AM8, 100% de germinação.

A modalidade G4 do genótipo AM19, teve 0% de sementes germinadas, uma vez que todas as sementes se encontravam com o embrião decomposto.

Quadro 10 - Percentagem de germinação dos quatro genótipos em cada tratamento do ensaio 1- Efeito dos pré-tratamentos e estratificação na germinação, com os embriões das sementes decompostos ou necrosados, retiradas.

Genótipo	Tratamento	% de germinação
AM8	T0	28,7 BCDEFGHI
	T1	16,0 FGHI
	F1	87,4 ABCDE
	F2	44,7 ABCDEFGHI
	G1	90,9 ABC
	G2	100 A
	G3	80,1 ABCDEF
	G4	71,7 ABCDEFG
AM11	T0	29,4 BCDEFGHI
	T1	9,5 GHI
	F1	31,7 BCDEFGHI
	F2	25,0 CDEFGHI
	G1	42,0 ABCDEFGHI
	G2	86,3 ABCDE
	G3	43,2 ABCDEFGHI
	G4	23,8 DEFGHI
AM17	T0	23,4 EFGHI
	T1	16,8 FGHI
	F1	75,0 ABCDEFG
	F2	91,4 AB
	G1	87,5 ABCDE
	G2	89,9 ABCD
	G3	2 I
	G4	100 A
AM19	T0	39,1 ABCDEFGHI
	T1	10,7 GHI
	F1	85,0 ABCDE
	F2	30,0 BCDEFGHI
	G1	50,0 ABCDEFGHI
	G2	71,5 ABCDEFGH
	G3	5,4 HI
	G4	0 I
Prob (F)		
	Genótipo	<0,001
	Tratamento	<0,001
	Genótipo X Tratamento	<0,001

Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha \leq 0,05$, em que letras diferentes em coluna ou linha indicam valores estatisticamente diferentes; N = 4 placas de Petri contendo 25 sementes cada, por tratamento em todos os genótipos

4.2.2. Ensaio 2. Efeito de diferentes ciclos de alta/baixa temperatura

No presente ensaio foram simuladas condições do campo no laboratório, ou seja, as sementes foram sujeitas a ciclos de diferentes temperaturas, simulando as estações do ano (40°C ou 60°C e 4°C) e desta forma estudada a quebra dormência.

Ensaio 2.1

As sementes submetidas durante várias semanas a 60°C, temperatura demasiado elevada para sementes de *C. album*, conduziram a taxas de germinação nulas, pelo que não foi efetuado tratamento dos dados.

Ensaio 2.2

Relativamente à percentagem de quebra do episperma acumulada, (Fig. 12, 13, 14 e 15) constatou-se que a modalidade apenas com um ciclo de alta e baixa temperatura, do genótipo AM17 (Fig.14), foi a que iniciou a quebra do episperma, aos 133 dias após o início do ensaio.

A modalidade Z3, com maiores ciclos de altas e baixas temperaturas, também foi a que obteve menor número de sementes com quebra do episperma.

A percentagem de quebra do episperma nos quatro genótipos relativamente a cada tratamento, foi semelhante no genótipo AM8 e AM11, sendo AM11 com maior número de sementes com episperma quebrado.

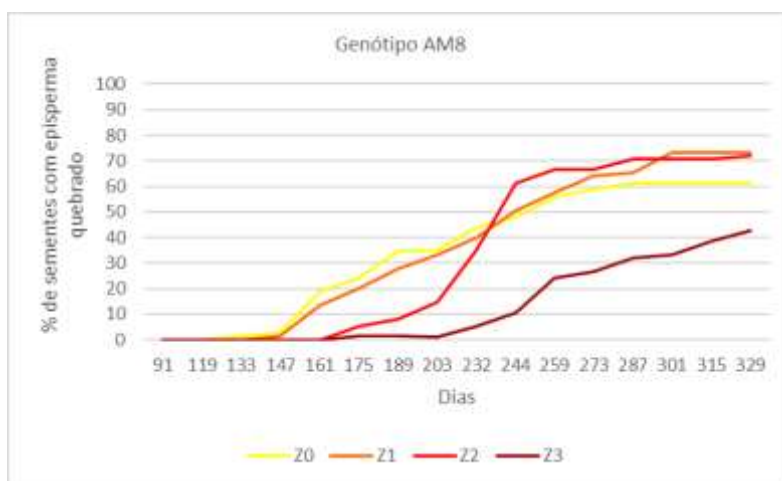


Figura 12 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de *C. album* do genótipo AM8;

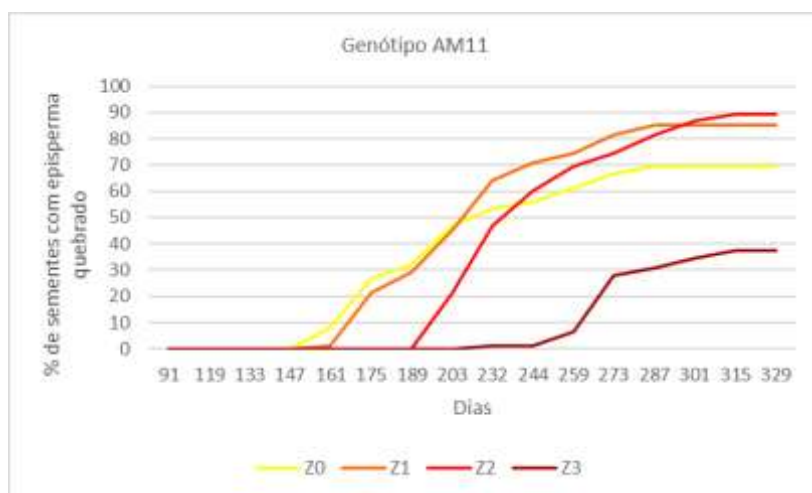


Figura 13 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de *C. album* do genótipo AM11;

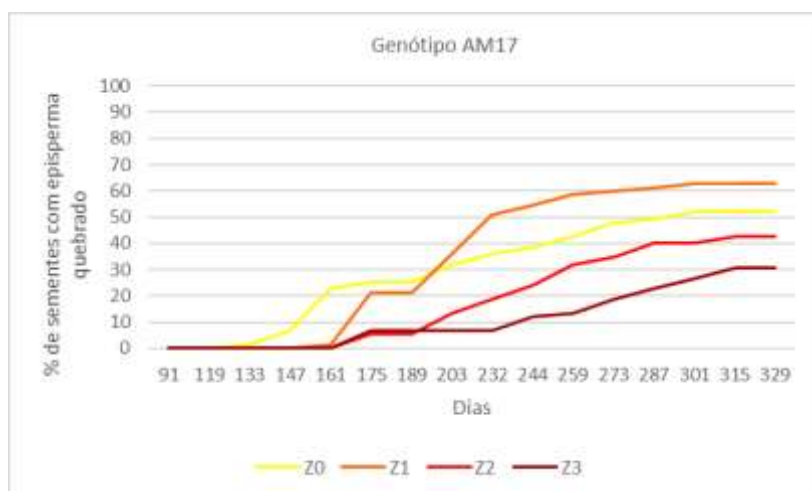


Figura 14 - Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de *C. album* do genótipo AM17

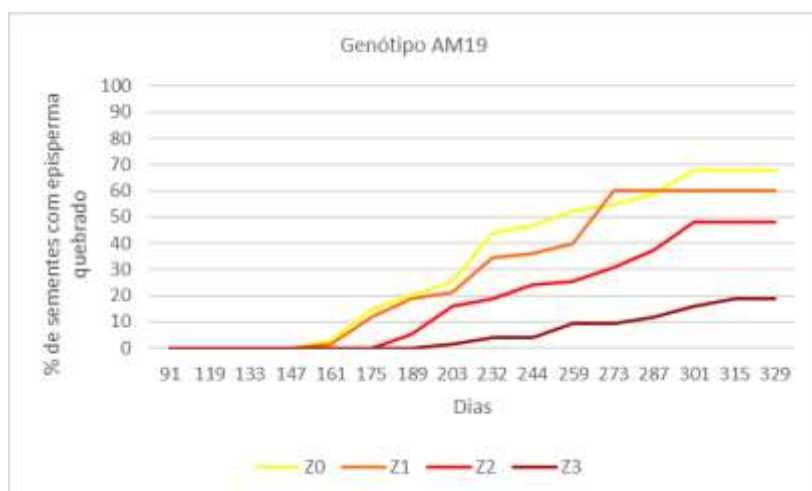


Figura 15- Ensaio 2.2: efeito do dos tratamentos de altas/baixas temperaturas na percentagem média de quebra do episperma cumulativa, de sementes de *C. album* do genótipo AM19

Neste ensaio a percentagem média de sementes germinadas (Quadro 11) diferiu significativamente entre genótipo e tratamento ($p < 0,001$). A maior percentagem obtida foi 49% no tratamento Z1, não sendo significativamente diferente de Z0 e Z2, com taxas de germinação de 46,0% e 48,0%, respetivamente.

Os genótipos AM8 e AM11, obtiveram uma percentagem de germinação semelhante, 46,0% e 55,0%, respetivamente. Os restantes dois genótipos (AM17 e AM19) foram semelhantes entre si, mas significativamente inferiores a AM8 e AM11, sendo o menor valor de germinação obtido por AM19 (20,7%).

Conclui-se que as altas temperaturas (40°C), em sementes de *C. album* seguida de baixas temperaturas (4/5 °C) quebra a dormência. Se as sementes de *C. album* são permeáveis à água (como referido anteriormente) mas necessitam de altas e baixas temperaturas (estratificação quente e fria) para germinação, significa que têm dormência fisiológica.

A modalidade Z0 (apenas 4 semanas a 40°C e quatro semanas a 4°C + 4 semanas a 40°C antes do início do ensaio) teve uma elevada percentagem de sementes germinadas, pelo que se poderá concluir que as sementes de *C. album* necessitam de dois verões para germinar. A modalidade Z3, que sofreu vários ciclos de altas e baixas temperaturas (simulando três Primaveras), obteve a menor percentagem de sementes germinadas (8,3%), pelo que, mais de três ciclos de calor poderão levar à perda de viabilidade das sementes.

Como verificado também na percentagem de quebra do episperma, o genótipo AM19 foi o que obteve menor percentagem de sementes germinadas, concluindo que a percentagem de germinações e quebra do episperma difere significativamente não só com o tratamento, mas também com o genótipo.

Neste ensaio (ensaio 2.2), não foram contabilizados o número de sementes com embrião decomposto uma vez o número de sementes germinadas foi muito superior ao ensaio 1 e observando a olho nu, não foram identificadas sementes inviáveis.

Quadro 11 - Percentagem de germinação média em cada genótipo nos diferentes tratamentos de altas/baixas temperaturas (ensaio 2.2).

Genótipo	% de Germinação
AM8	46,0 A
AM11	55,0 A
AM17	29,7 B
AM19	20,7 B
EP	4,98
Tratamento	
Z0	46,0 A
Z1	49,0 A
Z2	48,0 A
Z3	8,3 B
Prob(F)	
Genótipo	<0,001
Tratamento	<0,001

Teste de comparação múltipla de médias de Tukey para $\alpha \leq 0,05$, em que letras diferentes em coluna indicam valores estatisticamente diferentes; EP– Erro padrão da média; N = 25 sementes por tratamento.

De salientar que apesar da elevada percentagem de germinação de sementes da modalidade Z0, a modalidade Z1 foi a que obteve a maior percentagem de todo o ensaio (49,0%). Estes resultados estão de acordo com Baskin *et al.* (2002) que diz que a implicação de um requisito de estratificação quente-mais-frio para quebrar a dormência em sementes com dormência fisiológica intermediária é que estas sementes não germinarão até a segunda primavera. Ou seja, a exigência de estratificação quente não seria cumprida até o verão seguinte, e as sementes seriam estratificadas a frio durante o inverno subsequente.

No mesmo estudo, Baskin, *et al.* (2002), referente à germinação com sementes da *Empetrum hermaphroditum*, sementes igualmente de endocarpo lenhoso verificaram que a combinação de estratificação quente, durante 12 semanas (temperatura de 25°/15°C – temperatura alternada dia/noite, seguida de outra fria, durante 20 semanas (temperatura de 1°C), e posteriormente colocadas em câmara de germinação durante 6 semanas (T= 15°/6°C) levou a uma percentagem de germinação de 91%. Assim, os resultados obtidos estão de acordo com Baskin, *et al.* (2002).

Lopes (2015), concluiu que, face aos reduzidos valores da percentagem de germinação obtidos, a camarinha dificilmente germina em condições experimentais, tal como referido também por

outros autores (Clavijo *et al.*, 2003; Costa, 2011), conclusão que não está de acordo com o presente ensaio.

De acordo com Baskin *et al.* (2002) as sementes que amadurecem no outono, são de imediato sujeitas a temperaturas muito baixas não permitindo a estratificação quente. Assim, as únicas sementes que germinam na primavera seguinte, são aquelas com dormência fisiológica não profunda, isto é, as sementes que podem sair da dormência em resposta a uma estratificação a frio.

Como neste trabalho o GA₃ teve efeito na quebra da dormência (ensaio 1) pode-se afirmar que as sementes de *C. album* apresentam uma dormência fisiológica intermédia. No entanto o grau de dormência parece variar com o genótipo.

4.3. Análise das observações microscópicas dos cortes histológicos

Apenas com o quarto protocolo se obtiveram cortes íntegros.

Foi feita uma análise de sementes de todos os tratamentos do ensaio 1, em diferentes datas, para avaliar o estado de maturação do embrião, uma vez que estudos anteriores (Santos, 2013) referem que as sementes de *C. album* apresentam dormência morfológica.

Para além dos cortes histológicos observaram-se também, à lupa, todas as sementes no final do ensaio 1, verificando-se que todos os embriões se encontravam com os cotilédones formados (Fig. 16). As observações revelaram também que o embrião de forma linear, tem uma dimensão muito inferior ao endosperma. As sementes de *C. album* não apresentam dormência morfológica, uma vez que os embriões não se encontram subdesenvolvidos.

Das observações das sementes de frutos colhidas em outubro de 2016 e imediatamente observadas, apresentaram cotilédones já formados, o que confirma que as sementes de *C. album* não apresentam dormência morfológica, como referido anteriormente.

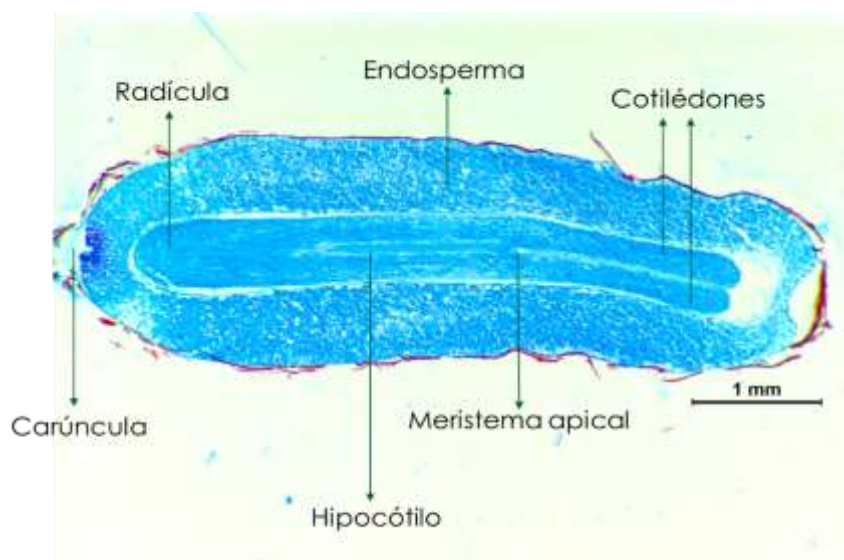


Figura 16 - Corte longitudinal de um embrião de *Corema album*.

Na análise dos cortes histológicos dos embriões de *C. album*, após embebição das sementes verifica-se que os genótipos AM8 e 11 estavam num estado de desenvolvimento anterior aos genótipos AM17 e AM19 (Fig. 17).

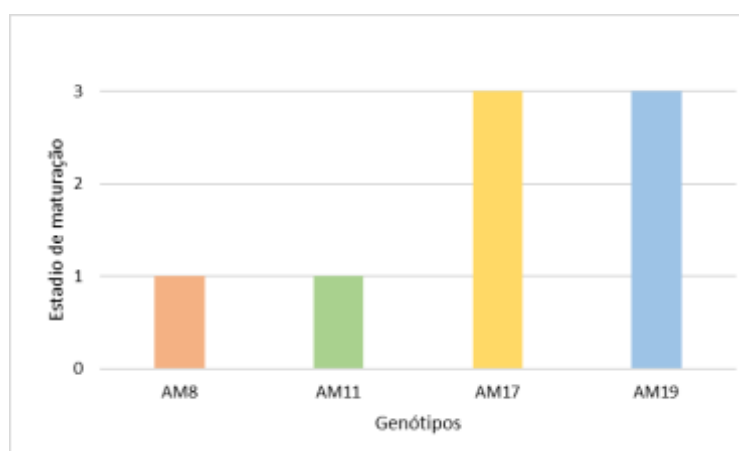


Figura 17 - Estádios de maturação do embrião a 3 de dezembro de 2016 (após embebição das sementes)

Na análise dos cortes histológicos dos embriões de *C. album*, antes da aplicação de GA₃, não se verifica qualquer padrão de desenvolvimento associado à escarificação química e à estratificação (Fig. 18).

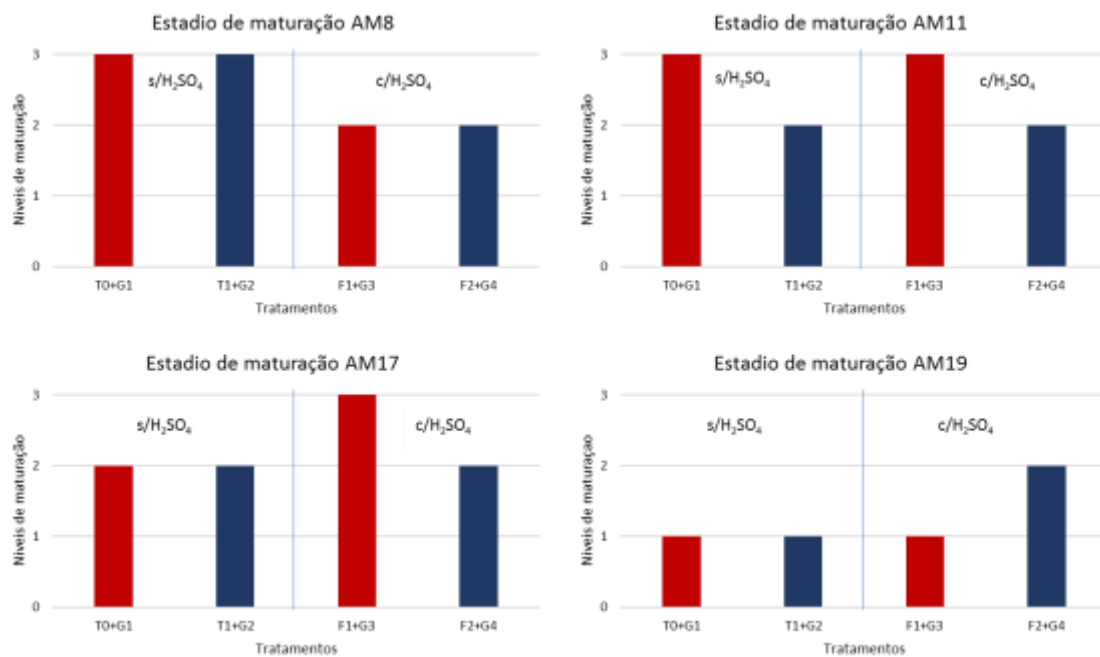


Figura 18 - Estádios de maturação do embrião a 19 de maio de 2016 antes da aplicação GA₃.

Constata-se que não há nenhum tratamento nem genótipo que se destaque, no desenvolvimento do embrião no final do ensaio (Fig.13), sendo o desenvolvimento do embrião muito heterogêneo dos diferentes genótipos e tratamentos.

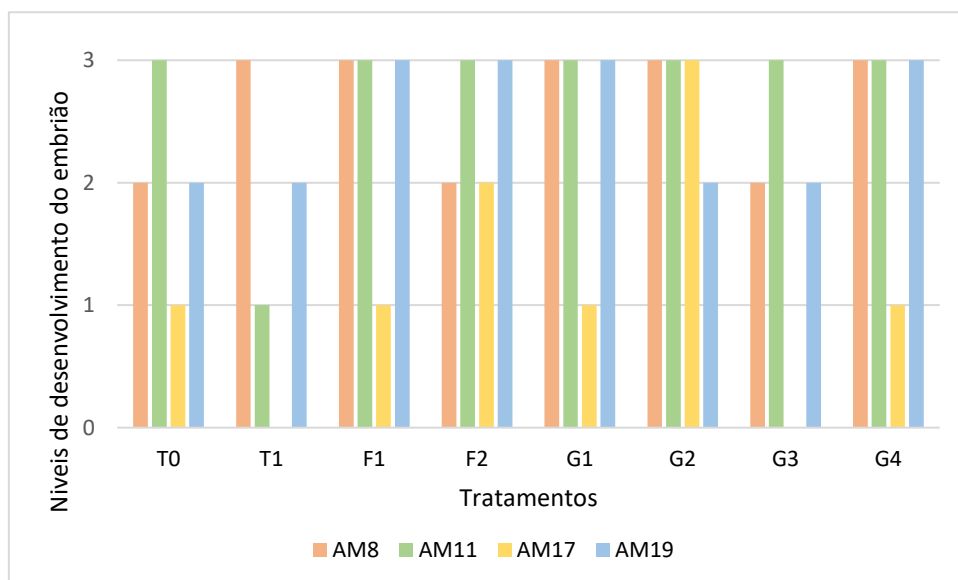


Figura 19 - Estadio de desenvolvimento dos embriões de *C. album*, a 10 de outubro de 2016, data correspondente ao final do ensaio.

5. Conclusões e Perspetivas

Relativamente à morfologia da semente, foi identificada uma estrutura, que permite as trocas gasosas e de água com o meio, facto que permite antecipar a ausência de dormência física, tal como foi constatado no estudo de Santos (2013). A água poderá não ser absorvida por todo o tegumento, como Santos (2013) referiu no seu estudo, mas sim pela entrada através da cicatriz micropilar. Todas as sementes foram colocadas com a cicatriz micropilar posicionada de forma a estar em contacto com a superfície húmida permitindo, desta forma, a entrada de água dentro da semente facto que poderá ter contribuído para que a germinação fosse superior ao verificado em estudos anteriores.

No que diz respeito à germinação de sementes de *C. album*, verificou-se uma maior percentagem média absoluta de germinação em sementes sem escarificação química, mas com estratificação quente e fria e aplicação de GA₃ (ensaio 1). No entanto, três ciclos de alta/baixa temperatura, (40°C, durante 4 semanas) permitiram obter as maiores taxas de germinação em todos os genótipos (ensaio 2.2). Estes valores são superiores a todos os referidos na bibliografia, (2,4% ao fim de 5 meses - Lopes, 2015; 14% ao fim de 5 meses - Clavijo *et al.*, 2003; 6,7% - Calviño-Cancela, 2004; 23% ao fim de 11 meses - Costa, 2011; 7,4% em 6 meses - Santos, 2013). Conclui-se que a estratificação quente e fria é uma parte da sequência de condições ambientais necessárias para quebrar a dormência fisiológica. No habitat natural, as altas temperaturas de verão têm uma influência preponderante na germinação das sementes.

Concluiu-se, assim, que as sementes de *C. album* possuem dormência fisiológica intermédia, uma vez que a estratificação quente e fria foi suficiente para quebrar a dormência.

Na análise de embriões e respetivos estádios de desenvolvimento, verificou-se que o embrião de *C. album* é linear, envolvido em endosperma com área superior ao seu tamanho. No que diz respeito aos estádios de maturação nas diferentes fases de desenvolvimento da semente, verificou-se uma enorme heterogeneidade nos níveis de desenvolvimento, apesar de todos os embriões se encontrarem desenvolvidos, concluindo que não existe dormência morfológica, contrariamente ao referido por Santos (2013).

O genótipo AM8 é estatisticamente muito diferente ($p < 0,001$) dos restantes, relativamente ao peso, diâmetro e área, sobretudo quando comparado com AM17 e AM19, o que permite concluir que sementes menores têm uma percentagem de germinação mais elevada.

Verificou-se também diferentes respostas aos diversos tratamentos em função do genótipo. O genótipo AM8, obteve uma percentagem de germinação média superior em quase todos os tratamentos, facto que permite concluir que a germinação de sementes varia não em função do tratamento aplicado, mas também do genótipo, ou seja, o genótipo influencia a germinação das sementes, contrariamente ao observado em estudos anteriores (Clavijo, *et al.*, 2003 e Santos, 2013).

No presente estudo, não se fizeram testes de viabilidade para selecionar apenas as sementes que se encontravam viáveis, o que poderá ter influenciado negativamente na percentagem de

germinação. Em estudos futuros estes testes serão necessários para obter uma percentagem de sementes mais precisa.

6. Referências bibliográficas

- Aguiar, C. (2013a) – Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente: Morfologia e Função. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 1. 48p.
- Aguiar, C. (2013b) – Botânica para Ciências Agrárias e do Ambiente: Reprodução e Evolução. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança, 2. 86p.
- Alvaréz-Casino, L., Zunzunegui, M., Díaz Barradas, M.C., and Esquivias, M.P. (2010) – Gender-specific costs of reproduction on vegetative growth and physiological performance in the dioecious shrub *Corema album*. *Annals of Botany* 106 (6): 989-998.
- Andrade S., Gonçalves F. J., Guiné, R. P. F. (2015) - International Conference of engineering - Food Engineering and Properties: Physical-chemical properties of *Corema album* (white crowberry or camarinha). University of Beira Interior, Portugal. 8p.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M. (2001) - Seeds. Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. San Diego: Academic Press, 666p.
- Baskin, C. C., Baskin, J. M. (2004) - A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14(1). 1-16.
- Baskin, C. C., Zackrisson, O., Baskin, J. M. (2002) - Role of warm stratification in promoting germination of seeds of *Empetrum hermaphroditum* (empetraceae), a circumboreal species with a stony endocarp: *American Journal of Botany* 89(3): 486–493.
- Baskin, J.M. & Baskin C.C. (1990) - Germination ecophysiology of seeds of the winter annual *Chaerophyllum tainturieri*: a new type of morphophysiological dormancy. *Jour. Ecol.* 78:993–1004.
- Baskin, J.M. & Baskin C.C. (1998) - Greenhouse and laboratory studies on the ecological life cycle of *Dalea foliosa* (Fabaceae), a federal endangered species. *Nat. Areas Jour*, 18:54–62.
- Baskin, J.M., Baskin, C.C. & Li. X. (2000) – Taxonomy, anatomy and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biol*, 15:139–152.
- Bewley, J. D. Black, M. (1982) – Physiology and biochemistry of seeds, Berlin: SpringerVerlag. (2).
- Bewley, J., Kent, J. B., Henk W.M. H., Nonogaki H. (2013) – Seeds. Physiology of Development, Germination and Dormancy. 3^a ed. New York: Springer. 392p.

- Bianchetti, A.; Ramos, A. (1981) - Quebra de dormência de sementes de canafístula *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taubert resultados preliminares. Boletim de Pesquisa Florestal, (3), 87-95.
- Bradbeer J.W. (1988) – Seed Dormancy and Germination. USA: New York 146p.
- Brasil, M.B.S. (2008) - Efeito do Ácido Giberélico (GA₃) na aceleração do processo germinativo de sementes do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). Curso Superior em Tecnologia da Cafeicultura. Escola Agrotécnica Federal de Muzambinho. Muzambinho, 25p.
- Calviño-Cancela, M. (2000). - Ecología de la regeneración natural de una población de camarina (*Corema album*) en las Islas Cíes. MSc Thesis. Universidade de Vigo, Spain.
- Calviño-Cancela, M. (2002) - Spatial patterns of seed dispersal and seedling recruitment in *Corema album* (Empetraceae): the importance of unspecialized dispersers for regeneration. Journal of Ecology, 90(5). 775-784.
- Calviño-Cancela, M. (2004) - Ingestion and dispersal: direct and indirect effects of frugivores on seed viability and germination of *Corema album* (Empetraceae). Acta Oecologica, 26(1): 55-64.
- Calviño-Cancela, M. (2005) - Fruit Consumers and seed dispersers. Rev. Écol. (Terre Vie), (60), 97-106p.
- Calviño-Cancela M. (2007) - Seed and Microsite Limitations of Recruitment and the Impacts of Post-Dispersal Seed Predation at the within Population Level. Plant Ecology, 192(1). 35-44.
- Capelanes, T. M. C. (1991) - Quebra-de-dormência em sementes florestais, em laboratório: Simpósio brasileiro sobre tecnologia de sementes florestais, Atibaia. São Paulo: Instituto Florestal, 41p. chaparral by the introduced succulent *Carpobrotus edulis*. *Oecologia*, 95:14-21.
- Clavijo, A., Díaz Barradas, M.C., Ain.Lhout, F., Zunzunegui, M. & Correia, O. (2002) – A fragmentação como causa principal da redução do habitat de *Corema album* na sua área de distribuição. Revista Biol. (Lisboa). 20: 109- 120.
- Clavijo A.; Díaz Barradas, MC.; Zunzunegui, M.; Ain-Lhout, F.; Alvarez Cansino, L. Correia, O. & García Novo, F. (2003) - A conservação de *Corema album* no litoral atlântico da Península Ibérica; a influência de dispersores animais na regeneração natural. Revista Biologia (Lisboa), 21: 43-56.

- Costa, C.A. (2011) - Fatores que condicionam a dispersão e o recrutamento da camarinha em sistemas dunares.] Lisboa: Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia da Conservação. 42p.
- D'Antonio C. M., Odion D. C., Tyler C. M. (1993) - Invasion of maritime chaparral by the introduced succulent *Carpobrotus edulis*: The roles of fire and herbivory. *Oecologia* 95: 14–21.
- Edwards, T.I. (1932) -Temperature Relations of Seed Germination. *The Quarterly Review of Biology*, 7(4): 428-443.
- Fedriani, J. M.; Delibes, M. (2009) - Functional diversity in fruit-frugivore interactions: a field experiment with Mediterranean mammals. *Ecography*, 32(6) 983-992.
- Finch-Savage, W. E.; Leubner-Metzger, G. (2006) - Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171(3): 501-523.
- Franco, J. A. (1984) - Nova Flora de Portugal (Continente e Açores). Clethraceae-Compositae. Lisboa: Sociedade Astória, Lda, 1984. Vol. 2. 659p.
- Gonzalez, G. A. L. (2001) - Los Árboles y Arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares, Mundi-Prensa, Madrid 2: 1727.
- Gosling, P. G. (2003) - Viability testing ; Smith RD, Dickie JB, Linington SH, Pritchard HW, Probert RJ, In *Seed conservation: turning science into practice*. UK: Kew Publishing. 445-481, capítulo 24.
- Guerra, M. P., Nodari R. O., Reis, A., Grando J. L. (1982) - Comportamento da canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert) em viveiro, submetida a diferentes métodos de quebra de dormência e sementeira. *Boletim de Pesquisa Florestal*, (5): 1-15.
- Gutián, P., Medrano, M., and Rodríguez, M. (1997) - Reproductive biology of *Corema album* (L.) D. Don (Empetraceae) in the northwest Iberian Peninsula. *Acta Botanica Gallica* 144: 119-128.
- Hartmann, H T., Kesters, D. E., Davis, F. T., Geneve R. L. (1996) - *Plant Propagation: Principles and Practices*. 6ª ed. Prentice Hall, 770p.
- Jensen, W. A. (1962) - *Botanical histochemistry: principles and practice*. Ed: W. H. Freeman and Company. San Francisco. 408p
- Kermode, A. R. (2011) - *Seed Dormancy: Methods and Protocols*. Department of Biological Sciences:Simon Fraser University, Burnaby.440p.

- Koornneef, M., Bentsink, L. & Hilhorst, H. (2002) - Seed dormancy and germination, *Plant Biology*, 5:33–36.
- Kozlowski, T. T. (1971) - *Physiological Ecology- Growth and Development of Trees*, department of forestry, university of Wisconsin. Madison, Wisconsin, 1. 443p.
- Labouriau, L., Osborn, J.H. (1984) -Temperature dependence on the germination of tomato seeds. *Journal of Thermal Biology*, 9:285-294.
- Larrinaga, Asier R. (2010) - Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) select small seeds when feeding on the fruits of *Corema album*, 25(1) 245-249.
- Lopes, M.R.M. (2015) - Coelho-bravo como facilitador da invasão do Chorão nos sistemas dunares:Implicações para a conservação de uma espécie Endêmica (*corema album*). Lisboa: Universidade de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ecologia e Gestão Ambiental. 51p.
- Magalhães, T. T. A. (2015) - Propagação e fenologia da *Corema album* (L.) D.Don: Ensaio de propagação vegetativa por estaca; Caracterização fenológica e proposta de escala BBCH. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agronómica. 80p.
- Marques, E. M. S. (2007) - Caracterização das populações de Camarinha (*Corema album* L.) no Cabo Carvoeiro. Lisboa: Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Terra e da Vida para o Ensino.72p. Disponível em http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1332/1/19843_ulfc080510_tm.pdf
- Martin, A.C. (1946) - The comparative internal morphology of seeds. *The American Midland Naturalist*, 36(3):513-660.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. (1975) - *The Germination of Seeds*. 2ª ed. Oxford: Pergamon Press, .5:192p.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A. (1978) - *The germination of plants*. 4.ed. Oxford: Pergamon Press. 270p.
- McDonald, M. B., Kwong, F. Y. (2005) - *Flower Seeds: Biology and Technology*, CABI Publishing editor, USA. 383p.
- Nakagawa, J. (1980) - *Sementes Ciência, tecnologia e produção*. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill. 46p.

- Nikolaeva, M. G. (1969) - Physiology of deep dormancy in seeds. IPST Press, Jerusalem. 220 p.
- Oliveira, P.B. & Dale, A. (2012) – *Corema album* (L.) D. Don, the white crowberry - a new crop. Journal of Berry Research. 2: 123-133.
- Oliveira, P. B., Valdivieso, T., Trindade C. S., Evaristo, I., Nóbrega, F., Lima, A.A., Silva, A.R., Santos, M., Magalhães, T., Lisboa, A. Oliveira C. M. (2016) - Os primeiros passos na investigação em *Corema album* (camarinha) . Vida Rural.-64:29-31.
- Ortiz, S., Rodríguez O.J. & Pulgar, I. (1998) - Unha primeira aproximación ao listado la flora rara e amenazada de Galicia (NO da Península Ibérica). Nova Acta Cient. Compos. (Biol.), 8: 95-101.
- Propinigis, F. (1985) - Fisiologia da semente. 2.ed.- Brasília-DF; 87p.
- Rolston, M. Philip (1978) - Water impermeable seed dormancy. The Botanical Review, 44(3): 365-396.
- Santos, C., Tavares, L. R., Pontes, V., Alves, P. M., McDougall, G. J., Stewart, D., and Ferreira, R. B. (2009) - Portuguese crowberry (*Corema album*), an interesting antioxidant white berry. 4th International Conference on Polyphenols and Health, Harrogate, UK, 7-11 December 2009 (Poster). 13p.
- Santos, M., Oliveira, C., Valdivieso, T., and Oliveira, P.B. (2014) - Effects of pretreatments on *Corema album* (L.) D. Don (subsp. album) seeds germination. Journal of Berry Research. 4: 183-192.
- Santos, M.S.S. (2013) - Efeito de pré-tratamentos na germinação de sementes da espécie *Corema album* L. (subsp. album). Lisboa: Instituto Superior de Agronomia. 89p. Universidade de Lisboa. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Agrónómica – Hortofruticultura e Viticultura.
- Simmonds N.W., Blackwell, W. (1999) - Principles of Crop Improvement, Longman. 2 ed. 424p.
- Toledo, F. R. & Marcos F.J. (1977) - Manual de Sementes: tecnologia da produção. São Paulo: Agronomia Ceres. 224p.
- Toole, V, K. (1973) - Effect of light, temperature and their interaction on the germination of seeds. Seed Sci.& Tech, 39p.
- Traveset, A., Rodriguez-Pérez, j., Pias, B. (2008) - Seed trait changes in dispersers' guts and consequences for germination and seedling growth. Ecology, 89(1): 95-106

Tutin T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M., and Webb D. A. (1972) – *Flora Europea. Diasporaceae to Myoporaceae*, Cambridge University Press, Cambridge 3: 70p.

Valdivieso, T. (1991) - *Biologia Floral da Nogueira (J. regia L.)*. Tese de Mestrado. Estação Nacional de Fruticultura de Vieira Natividade. Instituto Nacional de Investigação Agrária. Alcobaça. 85p.

Willard W. R. (1890) - *Proceedings of the American Society of Microscopists, Thirteenth Annual Meeting*, Ithaca, New York. 208-252:12 p.

Anexos

Anexo I - Protocolos de histologia

Protocolo 1.

Fixação

O fixador utilizado foi F.A.A. composto por formaldeído, ácido acético glacial e álcool etílico 70% na proporção 1:1. A duração da fixação foi de quatro dias, fixando a semente completa, com embrião e episperma. Após fixação, as sementes foram desidratadas. A duração da fixação foi igual para todas as sementes, uma vez que têm todas dimensões semelhantes.

Desidratação

As sementes foram gradualmente desidratadas numa série progressiva de etanol a 70% -80% - 95% -100%:

- (a) Etanol 70%: 4 dias
- (b) Etanol 80%: 2 horas
- (c) Etanol 96%: 2 horas
- (d) Etanol 100%: 48 horas

Clarificação

Após a desidratação, as sementes foram colocadas em HistoClear™ durante 4 dias.

Inclusão

As sementes desidratadas e clarificadas foram colocadas em frascos, devidamente identificados, com parafina líquida. Os frascos foram posteriormente colocados numa estufa com temperatura a 60 °C, uma vez que o ponto de fusão da parafina utilizada é de 56 a 60°C, para que o HistoClear fosse evaporado.

Protocolo 2

Anteriormente à fixação as sementes foram colocadas a hidratar em água destilada durante 3 dias.

Fixação

Procedeu-se da mesma forma descrita no ponto 1.i. do protocolo anterior.

Desidratação

As sementes foram gradualmente desidratadas numa série progressiva de etanol a 70% -80% - 95% -100%, como no protocolo anterior, mas com durações distintas:

- (a) Etanol 70%: 4 dias
- (b) Etanol 80%: 4 dias
- (c) Etanol 96%: 24 horas
- (d) Etanol 100%: 4 dias

A clarificação e a inclusão seguiram a metodologia do protocolo 1.

Protocolo 3

Anteriormente à fixação, todas as sementes foram abertas para se retirar os embriões e colocadas 48 horas em H₂O, para facilitar e assegurar uma eficiente penetração do fixador.

i) Fixação

Procedeu-se da mesma forma descrita no protocolo 1

ii) Desidratação

Utilizou-se uma serie de desidratação constituída por crescentes concentrações de etanol 70% -80% -95% -100%, como no protocolo anterior, mas com períodos distintos:

- (a) Etanol 70%: 2 horas
- (b) Etanol 80%: 2 horas
- (c) Etanol 96%: 2 horas
- (d) Etanol 100%: 2 dias

A clarificação e a inclusão seguiram a metodologia do protocolo 1.

Anexo II – Análise estatística da percentagem de germinação nos ensaios 1 e 2

1. Percentagem de germinação radicular contabilizando inviáveis (Ensaio 1) - variável transformada arcseno raiz quadrada($X/100$) ($X/100$), sendo x= percentagem de sementes germinadas, com radícula >1 mm

Analysis of Variance Table for nova

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	3	0.2317	0.07725		
Gen	3	4.3492	1.44974	10.55	0.0000
Trat	7	11.4399	1.63427	11.89	0.0000
Gen*Trat	21	9.8819	0.47057	3.42	0.0000
Error	93	12.7788	0.13741		
Total	127	38.6816			

Grand Mean 0.8049 CV 46.05

2. Percentagem de germinação radicular, considerando a totalidade das sementes (ensaio 1) – variável transformada arcseno raiz quadrada ($X/100$), sendo x= percentagem de sementes germinadas, com radícula >1 mm

Analysis of Variance Table for nova

Source	DF	SS	MS	F	P
Rep	3	0.00076	0.00025		
Gen	3	3.69630	1.23210	78.58	0.0000
Trat	7	2.41615	0.34516	22.01	0.0000
Gen*Trat	21	1.98558	0.09455	6.03	0.0000
Error	93	1.45821	0.01568		
Total	127	9.55700			

Grand Mean 0.4238 CV 29.54

3. Percentagem de germinação radicular ensaio 2.2

Analysis of Variance Table for per

Source	DF	SS	MS	F	P
re	2	468.7	234.33		
Gen	3	8673.3	2891.11	19.40	0.0000
Tratament	3	13980.0	4660.00	31.28	0.0000
Gen*Tratament	9	2454.7	272.74	1.83	0.1036
Error	30	4470.0	149.00		
Total	47	30046.7			

Grand Mean 37.833 CV 32.26